

LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS NA AVALIAÇÃO AGUDA DO
EFEITO MUTAGENICO DOS CONTAMINANTES ATRAZINA E CLORETO DE
COBRE EM *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, com área de concentração em Genética.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2011

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **Laercio Dante Stein Piancini** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 14 de fevereiro de 2011



Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Universidade de Brasília
Membro Titular



Prof. Dr. Marcos Vinícius Ferraro
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Titular



Professora Doutora Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Visto:



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



À minha família, com carinho, amor e gratidão.

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado
até que seja enfrentado.”*

Albert Einstein

Agradecimentos

À Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, por todo ensinamento, dedicação e confiança depositada.

Aos professores Roberto Ferreira Artoni e Marina Isabel Mateus de Almeida pelo acompanhamento durante estes dois anos.

Aos Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia e Marcos Vinícius Ferraro pela presença na banca examinadora e pela excelente colaboração.

À Profa. Dra. Lupe Furtado Alle, por todos os valores e ensinamentos transmitidos durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e a Fernanda Wiltemburg, do LabQAM (Laboratório de Química Ambiental), pelas análises químicas realizadas.

Aos meus amigos Luis Felipe, Luiz Fernando, Marcel, David, Flávio e Milico, pelas horas de descontração.

Aos meus colegas da turma de mestrado e doutorado, por todas os momentos de companheirismo, estudos, lazer, e festas, principalmente festas! Em especial, gostaria de agradecer a Mariane, Thaís, Larissa, Rodrigo Schuh, Cynthia, Elisandro, Georgia, Heloísa, Kaline, Ricardo, Juliana e Naieli.

À todos colegas do Laboratório de Citogenética Animal, Gabi, Aurea, Luiz, Gustavo, Toni, Paula, Manu, Tati, Taynah.... em especial a Wanessa, por todo ensinamento ao longo desses anos, e à Dayanne por toda a ajuda prestada.

À minha família, por todo apoio nas horas de maior dificuldade.

À Karina, por todo amor, dedicação e companheirismo.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo.....	x
Abstract	xi
Prefácio.....	xii
INTRODUÇÃO	1
BIOENSAIOS	2
AGROTÓXICOS	5
OS METAIS	11
METAIS LÁBEIS	12
CLORETO DE COBRE.....	13
BIOMARCADORES	16
TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO	17
ENSAIO COMETA	21
BIOINDICADORES	23
ASPÉCTOS ECOLÓGICOS DE <i>Rhamdia quelen</i>	24
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CAPÍTULO I.....	28
CAPÍTULO II	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	83
MATERIAL E MÉTODOS	83
TABELAS	91

Lista de figuras

INTRODUÇÃO

Figura 01- Fórmula estrutural da Atrazina. Adaptado de COX, 2001.....	8
Figura 02 – Micronúcleo e alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao CuCl ₂	20
Figura 03 – Cometas observados com aumento de 400x.....	22
Figura 04 – Exemplares de Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	25

CAPÍTULO I

Figura 01 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento estático.....	42
Figura 02 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com atrazina no experimento estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais.....	42
Figura 03 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático.....	43
Figura 04 - Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento semi-estático.....	43
Figura 05 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com atrazina no experimento semi-estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais.....	44
Figura 06 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento semi-estático.....	44

CAPÍTULO II

Figura 01 – Micronúcleo e alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao CuCl ₂ . (A) Células normais; (B) binúcleo; (C) <i>Lobed</i> ; (D) <i>Blebbid</i> ; (E) <i>Notched</i> ; (F) Micronúcleo e (G-H) Vacuolos.....	66
Figura 02 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento estático.....	67
Figura 03 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com CuCl ₂ no experimento estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais.....	67

Figura 04 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático.....	68
Figura 05 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento semi-estático.....	68
Figura 06 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com CuCl_2 no experimento semi-estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais.....	69
Figura 07 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático.....	69

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO

TABELA 01 - Estimativa do Mercado de Defensivos. Período de Janeiro à Setembro de 2007 vs 2008.....	6
---	---

CAPÍTULO I

TABELA 01 – Comparação entre os escores obtidos nos experimentos estático e semi-estático, através do ensaio cometa em células braquiais e eritrócitos.....	45
---	----

CAPÍTULO II

TABELA 01 – Frequência das diferentes alterações morfológicas encontradas nos experimentos estático e semi-estático. A tabela compara os diferentes tipos de alterações encontradas dentro de cada tratamento.....	63
--	----

TABELA 02 – Comparação entre os modelos experimentais. Mediana, primeiro e terceiro quartís (Q1-Q3) dos escores obtidos em células braquiais e eritrócitos dos experimentos estático e semi-estático.....	64
---	----

TABELA 03 – Quantificação total e lábil do cobre no experimento semi-estático. Concentração dada em $\mu\text{g.L}^{-1}$, determinada por ICP-OES.....	65
---	----

Lista de Abreviaturas

AMN – Alterações morfológicas nucleares

ATZ – Atrazina

BE – Experimento estático

BSE – Experimento semi-estático

CAT - Catalase

CTL – Controle negativo

DGT - Difusão em filmes finos por gradiente de concentração

DNOC - 2-metil-3,5-dinitrofenol

ECB – Ensaio cometa em brânquias

ECE – Ensaio cometa em eritrócitos

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

ICP-OES - Espectrometria de emissão atômica com plasma opticamente induzido

LMP – Agarose baixo ponto de fusão

MNP – Teste do micronúcleo píceo

MN – Micronúcleo píceo

ROS – Espécie reativa de oxigênio

SOD – Superoxido desmutase

US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*

WHO – *World Health Organization* (Organização mundial da saúde)

Resumo

A maioria dos recursos biológicos da Terra estão localizados em ambientes costeiros e nos grandes sistemas de bacias fluviais. No entanto, mais de 3 bilhões de pessoas vivem em estreita proximidade desses locais. Como consequência dessa situação, grande parte dos resíduos gerados, tanto industriais como domésticos, ocorrem nessas áreas. A atrazina é utilizada desde os anos 50, sendo desde então um dos herbicidas mais utilizados no mundo, com estimativas de aplicação entre 70.000 e 90.000 toneladas por ano. Esse produto foi banido na União Européia em 2004, no enquanto continua sendo o segundo herbicida mais utilizado no mundo. O cobre é um micronutriente para a vida, presente em todos os ambientes aquáticos naturais e sedimentos. No entanto, ele pode se tornar prejudicial quando sua concentração ultrapassa certos limites naturais, sendo considerado um dos metais mais tóxicos para peixes. Os sais de cobre são intencionalmente introduzidos nos corpos d'água como herbicidas, algicidas e moluscicidas em todo o mundo. Resultados controversos sobre a toxicidade da atrazina foram obtidos por diferentes autores nos últimos anos, e poucos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando o sal cloreto de cobre (II) para se avaliar os efeitos desse metal sobre organismos aquáticos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial genotóxico da Atrazina e do Cloreto de Cobre em três concentrações, em biensaíes estático (BE) e semi-estático (BSE), utilizando o teste do micronúcleo pisceo (MNP) e o ensaio cometa em brânquias (ECB) e eritrócitos (ECE). Nossos resultados mostram efeitos deletérios ao DNA de *Rhamdia quelen*, expostos a todas as concentrações de atrazina, através do teste do micronúcleo písceo. ECE, em ambos experimentos, mostra um efeito dose-dependente do contaminante sobre o bioindicador, no entanto para brânquias apenas foram observados danos nas concentrações de 2 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no BSE. Danos ao DNA de eritrócitos foram observados através do MNP em concentrações de 9 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Tanto o ECE quanto o ECB foram capazes de detectar danos ao material genético das células em todas as concentrações teste. Apenas no BE a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não causou danos significativos em relação ao controle pelo ECB. Nossos resultados apontam para um efeito genotóxico dose-dependente de ambos contaminantes, sendo que existem indícios que a ATZ causa danos ao DNA de *Rhamdia quelen* mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira (2 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O mesmo pode ser dito para o cobre, sendo que os resultados obtidos pelo ensaio cometa, para ambos os tecidos, evidenciaram efeitos genotóxicos do metal na concentração de 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que é o limite estipulado pela legislação do país.

Abstract

Most of the Earth's biological resources are located in coastal environments and large systems of river basins. However, more than 3 billion people live in close proximity of these sites. As a consequence, most of the waste generated, both industrial and domestic, occur in these areas. Atrazine has been used since the 50's and has since been one of the most widely used herbicides in the world, with estimates between 70.000 and 90.000 application tonnes per year. This product was banned in the European Union in 2004, while still the second most used herbicide in the world. Copper is a micronutrient for life, present in all aquatic environments and natural sediments. However, it can become harmful when their concentration exceeds certain natural limits and is considered one of the most toxic metals to fishes. The copper salts are intentionally introduced into water bodies such as herbicides, algacides and molluscicides worldwide. Controversial results on the toxicity of atrazine were obtained by different authors in recent years, and few studies have been developed using the salt copper chloride (II) to evaluate the effects of this metal on aquatic organisms. Thus, the purpose of this study was to evaluate the genotoxic potential of Atrazine and copper chloride (II) in three concentrations, in bioassays static (BE) and semi-static (BSE), using the piscine micronucleus test (MNP) and the comet assay of gills cells (ECB) and erythrocytes (ECE). Our results showed deleterious effects to DNA of *Rhamdia quelen*, exposed to all concentrations of atrazine, through the piscine micronucleus test. ECE, in both experiments, showed a dose-dependent effect of the contaminant on the bioindicator, but only to gill damage was observed at concentrations of 2 and 100 μL^{-1} on BSE. DNA damage in erythrocytes were observed by MNP at concentrations of 9 and 18 μL^{-1} . Both the ECE and the ECB were able to detect damage to genetic material of cells at all concentrations tested. Just BE in the concentration of 2 μL^{-1} did not cause significant damage compared to control by the ECB. Our results suggest a dose-dependent genotoxic effect of both contaminants, and there are indications that the ATZ cause DNA damage in *Rhamdia quelen* although under the concentration allowed by Brazilian legislation (2 μL^{-1}). The same can be said for copper, and the results obtained by the comet assay for both tissues showed genotoxic effects of metal concentration in 9 μL^{-1} , which is the limit stipulated by the law of the country.

Prefácio

Essa dissertação é uma compilação de uma revisão bibliográfica e de dois capítulos que tratam sobre contaminação da espécie neotropical *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptaperidae) com um herbicida, a atrazina, e um metal, o cobre. A revisão bibliográfica, ou introdução geral, traz ao leitor uma ambientação sobre o contexto da contaminação dos recursos hídricos, bem como da utilização de defensivos agrícolas, em especial a atrazina.. Aborda também informações relevantes a respeito de metais pesados, sobre o cloreto de cobre (II), e mais especificamente sobre o cobre, e sua recente utilização em experimentações quanto à toxicidade. Uma boa noção sobre o uso de biomarcadores genéticos e sobre o desenvolvimento e utilização das metodologias utilizadas nesse trabalho, o teste do micronúcleo píceo e o ensaio cometa, podem ser obtidas na introdução geral.

O capítulo I trata da exposição do bioindicador a três diferentes concentrações de atrazina. Os resultados obtidos com brânquias e eritrócitos têm relevância para o momento atual do estudo das propriedades tóxicas desse composto, visto que atualmente parâmetros toxicológicos estão sendo revistos pela US-EPA para a atrazina, e uma futura discussão desse órgão acerca de diversos resultados obtidos através de uma gama de biomarcadores, além de parâmetros físico químicos, resultará no embargo da licença ou na continuidade do uso desse herbicida nos Estados Unidos, reconhecidamente um dos maiores consumidores do produto no mundo.

O segundo capítulo traz ao conhecimento do leitor os resultados obtidos através do teste do micronúcleo e do ensaio cometa sobre a genotoxicidade do cloreto de cobre, e mais especificamente sobre o metal cobre, visto que o sal se dissocia em água, gerando o Cu^{2+} . Um diferencial desse capítulo é a utilização de parâmetros químicos na quantificação do íon cobre durante o transcorrer do experimento pela utilização de DGT, que é capaz de quantificar a concentração do cobre lábil (biodisponível para o peixe) ao passar do tempo.

INTRODUÇÃO

Nossa espécie está sob constante exposição a substâncias químicas presentes em produtos de consumo, como medicamentos, alimentos, produtos de higiene pessoal, de limpeza e cosméticos, além da poluição ambiental bem como diversas fontes de radiação natural. Destes agentes físico-químicos, apenas uma parcela possui estudos que avaliam seus efeitos sobre os humanos e outros organismos (FERRARO, 2009).

A maioria dos recursos biológicos da Terra estão localizados em regiões específicas do globo, como os ambientes costeiros e os grandes sistemas de bacias fluviais. No entanto, mais de 3 bilhões de pessoas vivem em estreita proximidade desses locais, e em grande parte dependendo deles para retirar alimentos e matérias primas industriais. Como consequência dessa situação, grande parte dos resíduos gerados, tanto industriais como domésticos, ocorrem nessas áreas, que possuem maior importância biológica e econômica, comprometendo esses recursos e também a qualidade de vida humana (MOORE et al., 2004)

Durante as três últimas décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Este interesse foi intensificado em razão do constante crescimento populacional e o consequente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais.

Desde os anos sessenta a humanidade têm consciência do potencial de muitos produtos químicos em causar efeitos adversos para ecossistemas aquáticos e terrestres, em particular. O destino final de muitos destes contaminantes é o ambiente aquático, devido ao uso direto ou processos hidrológicos e atmosféricos (STEGEMAN e HAHN, 1994). A presença de xenobióticos em um ambiente aquático não é, por si só, indicativo de efeitos prejudiciais. Ligações entre a presença de compostos xenobióticos no ecossistema, o nível de exposição externa e os níveis de contaminação de tecidos devem ser estabelecidas. Muitos compostos hidrofóbicos, e seus metabólitos, que chegam aos ecossistemas aquáticos ainda precisam ser identificados, e seu impacto a vida aquática ainda não foi determinado. Dessa forma, toxicologistas ambientais vêm estudando extensivamente os efeitos de contaminantes químicos ou poluentes no ecossistema aquático (VAN DER OOST et al., 2003).

BIOENSAIOS

O conhecimento da toxicidade dos agentes químicos a diferentes organismos aquáticos possibilita, além do estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática, avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam a biota dos ambientes aquáticos. Utilizam-se, geralmente, metodologias simples nesse tipo de estudo, como por exemplo, testes de curto prazo para a avaliação de efeitos agudos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Quando se deseja compreender de melhor forma a ação tóxica de contaminantes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, os bioensaios, ou através de estudos no campo, os biomonitoramentos. Os bioensaios são utilizados para a obtenção de dados e padronização de metodologias. Eles permitem avaliar quais efeitos um dado xenobiótico, em determinada concentração, pode causar em determinada espécie. Por outro lado, estudos de campo possibilitam o acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente do local que está sendo analisado. Apesar de serem gerados dados complementares, deve-se atentar para o fato de que nem sempre os dados gerados sob condições experimentais podem ser intimamente relacionados com o ambiente natural (RAMSDORF, 2007). É difícil extrapolar dados obtidos em experimentos laboratoriais para o campo, devido a complexa mistura de químicos encontrada nos ambientes naturais, quase sempre expostos a diversos tipos de atividades antropogênicas.

Os bioensaios permitem estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência de diferentes variáveis ambientais. Os resultados obtidos nesses estudos não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, no entanto podem cooperar no sentido de criar uma base de dados que venha a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente (RAMSDORF, 2007).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse sobre a genotoxicidade em águas e sedimentos sendo que estes podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais, usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas. Interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando organismos aquáticos, como anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI et al., 1996).

Os métodos de exposição de peixes aos agentes genotóxicos, em laboratórios, são geralmente por imersão (quando os poluentes se encontram dissolvidos na água), através de

injeção intraperitoneal com o xenobiótico que está tendo sua genotoxicidade testada a ou por via trófica, quando as cobaias recebem alimentos previamente expostos ao tóxico pelo pesquisador.

Ensaio de toxicidade aguda podem ser definidos como sendo aquele que avalia os efeitos sofridos pelos organismos expostos ao xenobiótico por um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Baixo custo, fácil execução e curta duração são alguns dos fatores que levaram os testes agudos a serem os primeiros a serem desenvolvidos, e portanto constituem a base de dados em ecotoxicologia (BIRGE, 1995). A contaminação do ambiente por agentes agudamente tóxicos é facilmente detectada devido ao seu efeito imediato. No entanto, substâncias tóxicas crônicas produzem danos a longo prazo, influenciando na reprodução e manutenção dos organismos. Ações preventivas são necessárias nesse sentido, pois uma fonte de atividade genotóxica pode ser detectada somente depois de muitos indivíduos serem expostos por muitos anos. Dessa forma, esforços devem ser empregados na identificação de substâncias genotóxicas para que se possa fazer um controle de doses e diminuição de exposição (VILLELA, 2003).

A toxicidade de um agente químico também está relacionada ao tempo de exposição e a concentração da substância testada. Dessa forma, dependendo das características da substância-teste, como solubilidade, volatilidade, e bioacumulação, pode-se utilizar diferentes sistemas de exposição em ensaios de toxicidade laboratoriais, como os descritos a seguir de acordo com ARAGÃO & ARAÚJO (2006):

- *Sistema estático*: Os organismos são expostos a mesma solução durante o período do experimento, ou seja, a solução não é renovada. Apesar da facilidade na execução desse tipo de experimento, alguns problemas como a diminuição da concentração teste por volatilização, degradação microbiana ou transformação, absorção nos recipientes-teste, entre outros, podem ocorrer. Esse sistema é recomendado para testes de curta duração (ao redor de 48 horas), com substâncias não voláteis ou pouco degradáveis.

- *Sistema semi-estático*: Nesse sistema há troca parcial da solução-teste através de sua remoção, do preparo e da recolocação de novas soluções no recipiente-teste. Esse sistema é mais trabalhoso, e o aumento no manuseio dos organismos pode causar estresse ou danos aos mesmos. Esse sistema é usado quando a substância não é muito estável, ou quando se necessita de um teste mais prolongado. Geralmente esse tipo de sistema é empregado em testes de toxicidade crônica.

- *Sistema de fluxo contínuo*: As soluções-teste, nesse sistema, fluem continuamente através dos recipientes onde os organismos-teste estão. O fluxo deve ser capaz de manter constante a concentração da substância-teste.

Os poluentes mais comumente encontrados em corpos de água são: metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); pesticidas como bifenilas policloradas (PCBs), organoclorados (OC) e organofosforados, dioxinas e furanos; detergentes e outros componentes do esgoto urbano e da ocupação humana, sendo, portanto, estas as classes de compostos químicos mais amplamente utilizados em bioensaios (MARONI, 2000; VAN DER OOST et al., 2003).

AGROTÓXICOS

Os pesticidas, ou agrotóxicos, são produtos químicos utilizados na agricultura para o combate de pragas e têm utilização ampla, incluindo inseticidas, raticidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas e bactericidas. Herbicidas, particularmente, são agentes utilizados para destruir plantas daninhas e datam de antes de Cristo, quando os Romanos utilizavam lixo orgânico para manter as estradas. A partir de 1.800 d.C. intensificou-se o uso de herbicidas inorgânicos como sulfato de cobre, sulfato de amônio, arsenito de sódio e clorato de potássio na agricultura, pois com o cultivo de plantas de uma mesma espécie, teve início, também, o desenvolvimento de pestes e pragas na agricultura. Somente em 1935 foi produzido o primeiro herbicida orgânico, DNOC (2-metil-3,5-dinitrofenol), e a partir da década de 40 seguiu-se uma crescente produção e diversificação de herbicidas (JACOMINI, 2002).

Com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas, causando um grave desequilíbrio no solo e o desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis. Assim, passaram a ser utilizados diversos agro-químicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos (KLEMZ, 2002).

Devido à grande demanda de alimentos a humanidade enfrenta um grande dilema: ou aumenta sua fronteira agrícola, o que vem ocorrendo com grandes prejuízos ambientais, ou aumenta sua produtividade, o que também vem ocorrendo com a utilização de agrotóxicos. Toda cultura agrícola faz uso de algum tipo de agrotóxico em alguma fase de seu desenvolvimento, com exceção talvez da agricultura orgânica, a qual, também não está imune a aplicação de produtos químicos em sua prática, embora estes produtos sejam considerados naturais, estas misturas podem ser tóxicas (FERRARO, 2009).

Mesmo na região polar, onde não existe agricultura, pode-se detectar a presença de resíduos de inseticidas organoclorado, como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e o dicloro-difenil-etilcloro (DDE) em adiposo de mamíferos aquáticos (GRISOLIA, 2005). Embora muitos agrotóxicos sejam produzidos em países desenvolvidos apenas para exportação, eles podem acabar retornando ao país de origem, como no caso do kepone, que é produzido pelos Estados Unidos e utilizado em bananais na Guatemala, que por sua vez exporta bananas para os norte-americanos (GRISOLIA, 2005).

Segundo GRISOLIA (2005), o mercado latino americano de agrotóxicos é o que mais cresce, sendo que o Brasil corresponde a mais de 55% desse mercado. Além disso, nossas

áreas agrícolas estão em plena expansão, e as projeções são para o aumento do consumo de desses produtos, principalmente de herbicidas, que no Brasil representam mais de 50% das vendas desde 1994.

Nosso país é um dos maiores mercados na área de defensivos agrícolas. Em 1998, o volume de insumos fitossanitários consumidos colocou o país no 2º lugar mundial, movimentando, em 2003, cifras da ordem de 3,1 bilhões de dólares (ARMAS et al., 2005). Atualmente, os herbicidas continuam tendo posição de destaque no mercado interno. Dados da SINDAG (Sindicado Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) apontam que de 2007 para 2008 os lucros na venda de herbicidas no país aumentou em 45% (Tabela 01).

TABELA 01 - Estimativa do Mercado de Defensivos. Período de Janeiro à Setembro de 2007 vs 2008.

Segmentos	Mercado (em milhões de Reais)		
	2007	2008	% Variação
Herbicidas	2.685	3.881	45%
Fungicidas	1.351	1.721	27%
Inseticidas	1.916	2.456	28%
Acaricidas	127	159	25%
Outros	212	266	26%
TOTAL	6.291	8.484	35%

Os agrotóxicos constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas projetados especificamente para o controle de pragas em plantas. A sua aplicação ainda é o meio mais eficaz e aceito para a proteção de culturas contra pragas, e tem contribuído significativamente para o aumento da produtividade agrícola e maior rendimento das culturas (BOLOGNESI, 2003). Esses pesticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos intencionalmente ou indiretamente através de lixiviamento do solo à partir das áreas onde são aplicados (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Além do princípio ativo, a formulação dos agrotóxicos contém os agentes de dispersão e solubilizantes, também chamados de surfactantes. Conhecidos como substâncias inertes, esses componentes não tem função pesticida, no entanto podem ser biologicamente ativos e por vezes são esses os componentes mais tóxicos da fórmula (BOLOGNESI, 2003). Muitos

desses compostos são poderosos solventes orgânicos como xilenos, toluenos, alcoóis, cetonas, formaldeídos, benzenos, ácidos, etc. que possuem atividade tóxica bastante alta (GRISOLIA, 2005).

Agrotóxicos são um bom modelo para estudos da ecotoxicologia, pois eles contaminam a atmosfera, terra e água, sendo persistentes no meio ambiente. Entram nas cadeias ecológicas e nos ciclos biogeoquímicos, dispersam-se por todo o mundo causando efeitos tóxicos e adversos desde as bactérias até o homem (GRISOLIA, 2005).

ATRAZINA

As triazinas são um grupo de herbicidas químicos similares, registrados em 1955, como a atrazina, cianazina, propazina, ametrina e simazina, usadas para o controle de ervas daninhas, devido à capacidade desse composto de inibir a fotossíntese (JACOMINI, 2002) bloqueando o transporte de elétrons e levando a morte da planta por falta de energia. Em animais, os efeitos das triazinas são os mesmos, afetando a respiração celular pela inibição da síntese de ATP (THOMPSON, 1974). Os herbicidas triazinicos têm amplo potencial de contaminação de diferentes compartimentos ambientais em virtude de suas características, tais como: alto potencial de lixiviação e escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada à matéria orgânica (GRISOLIA, 2005).

Atrazina é utilizada a mais de 40 anos e atualmente é comercializada em mais de 80 países. A respeito desse uso intensivo, a atrazina é considerada segura porque tem um período de meia-vida curto e não sofre bioacumulação ou biomagnificação. Assim, ela parece causar poucos efeitos em adultos e foi reportado casos de anomalias e deformidades apenas quando utilizada em doses altíssimas (HAYES et al., 2002a).

O 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (Figura 01), ou atrazina, é um sólido cristalino branco, com um grupo químico básico (SOLOMON et al., 1996). Em anos recentes, aumentou a preocupação acerca da persistência da atrazina no ambiente (LONDOÑO, 2005). Pesquisas realizadas na Itália e nos Estados Unidos (Califórnia) demonstram que a atrazina é um dos poluentes mais comuns em águas superficiais e subterrâneas (COVA et al., 1989). Segundo KLIGERMAN et al., (2000a), pesquisadores da US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*), a atrazina é o herbicida triazinico mais presente nas águas subterrâneas dos Estados Unidos devido ao seu uso extenso e sua alta persistência em águas subterrâneas. Estima-se que entre 2 e 3 milhões de estadunidenses que

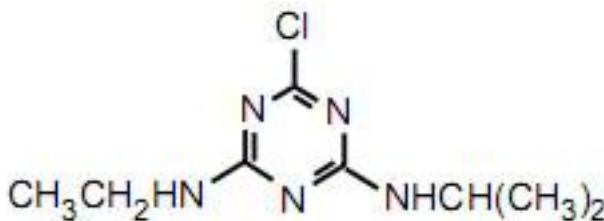


Figura 01: Fórmula estrutural da Atrazina. Adaptado de COX, 2001.

utilizavam água de lençol freático no abastecimento doméstico estão expostos a 0,2 µg/L de ATZ, que tem grande estabilidade em águas subterrâneas.

Na União Européia a atrazina foi recentemente retirada de uso e colocada na mesma classificação que a terbutilazina, no entanto no resto do mundo a atrazina continua sendo utilizada irrestritamente (SALABERRIA et al., 2009). O Jornal Oficial da União Européia (2004/248/EC), em 10 de Março de 2004, trás o informativo da decisão de retirar a autorização de qualquer produto que contenha a atrazina como ingrediente ativo em defensivos agrícolas, alegando que a concentração de ATZ, ou seus produtos de degradação, em águas subterrâneas em muitos locais já ultrapassava 0,1 µg/L, e que o uso contínuo desse herbicida poderia comprometer a recuperação da qualidade das águas subterrâneas.

Os resultados obtidos em estudos de mutagenicidade são bastante controversos para o grupo de herbicidas triazínicos, inclusive para a ATZ. LIOI et al., (1998), demonstraram um efeito genotóxico dose-dependente da atrazina sobre linfócitos humanos em um ensaio *in vitro*, utilizando como biomarcadores o teste de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs. Após 72 horas de exposição, pode-se observar aumento na frequência de aberrações cromossômicas e diminuição do índice mitótico nas células dos grupos expostos as concentrações de 8,5; 17 e 51 µM de ATZ. No ensaio de troca de cromátides irmãs, além dos grupos já citados, a menor concentração teste (5 µM) também apresentou um número maior de alterações em relação ao controle.

Também utilizando linfócitos humanos em um ensaio *in vitro*, e as mesmas técnicas de LIOI et al. (1998), KLIGERMAN et al., (2000a) não encontraram efeitos genotóxicos da atrazina em concentrações de 0,5; 1,5; 5 e 15 µg/ml de ATZ. Os autores alegam que algumas diferenças entre os diversos estudos que testam o potencial genotóxico da atrazina, tais como diferenças metodológicas, fonte e pureza do químico, solvente utilizado e análises estatísticas, podem estar contribuindo para os intrigantes relatos contraditórios existentes na literatura.

KLIGERMAN et al., (2000b), tentando refinar seus resultados, utilizaram o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Aplicando 125, 250 e 500 mg/kg de ATZ, eles não observaram aumento na frequência de micronúcleos em relação ao grupo controle. TENNANT, et al., (2001) recorreram ao ensaio cometa para pesquisar o potencial mutagênico da atrazina. Utilizando as mesmas concentrações de seu estudo anterior, eles conseguiram observar um aumento significativo do momento de cauda dos nucleóides observados nos animais expostos as concentrações de 250 e 500 mg/kg de atrazina. Nesse estudo, os autores contestam os resultados de LIOI et. al. (1998), que encontraram aumento na frequência de

aberrações cromossômicas de linfócitos em cultura, alegando que tais resultados não puderam ser reproduzidos por outros autores. Finalmente, os pesquisadores da US-EPA concluem que os níveis de ATZ encontrados nas águas de abastecimento, geralmente abaixo de 1 ppm, não constitui risco genotóxico para os estadunidenses que consomem essas águas.

No dia 07 de Outubro de 2009, a US-EPA lançou em nota um plano de trabalho intitulado: *Reavaliação científica da atrazina: Potenciais impactos à saúde*. Nesse plano estava previsto para o ano de 2010 a realização de experimentos internos para rever os possíveis potenciais cancerígenos da atrazina em modelos experimentais, além de estudos populacionais para avaliação de risco. Após a revisão desses dados, são previstos para 2011 a revisão dos efeitos da ATZ sobre anfíbios e o ecossistema aquático.

Utilizando a Tilápia (*Oreochromis niloticus*) como bioindicador, VENTURA et al., (2008) utilizaram o teste do micronúcleo pístico, alterações morfológicas nucleares e o ensaio cometa para testar o potencial mutagênico da atrazina em três diferentes concentrações: 6,25; 12,5 e 25 µg/L após um período de 72 horas de exposição. As autoras notaram aumento da frequência de micronúcleos nas três concentrações teste em relação ao grupo controle, sendo que o mesmo ocorreu para as alterações morfológicas nucleares, que apesar de também estarem presentes no controle, estavam em uma frequência significativamente menores. Os resultados obtidos através do ensaio cometa também apontaram o mesmo cenário, a atrazina causou danos elevados em relação ao grupo controle nas três concentrações testadas.

BYER et al., (2011), coletaram um número impressionante de 739 amostras de águas superficiais entre Abril e Outubro de 2007 em 158 localidades dentro dos grandes lagos e da bacia hidrográfica de St. Lawrence, Canadá. Os autores verificaram a presença de ATZ em praticamente todas as regiões monitoradas, sendo que as coletadas em regiões rurais apresentavam uma concentração superior àquelas coletadas em regiões urbanas. Coletas realizadas em estações de chuva apresentavam concentrações de atrazina até 10 vezes superior as coletadas em períodos de seca, evidenciando a importância das chuvas no carregamento de agrotóxicos dos solos para ambientes aquáticos. Os picos de atrazina foram observados em meados de Junho, na primavera, período que corresponde a aplicação pré planta nas culturas de milho e soja, e também com o período de maior precipitação na região de Ontário. Na região rural foram observados concentrações de atrazina entre 0,17 e 1,51 µgL⁻¹, 0,27 e 3,91 µgL⁻¹.

OS METAIS

Ignorou-se a contaminação do meio ambiente por metais pesados até 1932, quando ocorreu o trágico evento em Minamata, Japão, onde através da contínua descarga de metilmercúrio por efluentes de uma indústria de acetaldeído, ocorreu a contaminação da baía de Minamata, bioacumulação através da cadeia trófica e séria intoxicação ao homem, levando a centenas de mortes e diversos efeitos congênitos a população local (VAZQUEZ, 1999). Depois desse acidente, o mundo se viu obrigado a controlar os níveis de metais pesados nos ambientes naturais, principalmente o aquático (CAMPOS et al., 2009).

Fertilizantes, pesticidas, água de irrigação contaminada, e queima de biomassa na zona rural, queima de carvão e óleo, emissões veiculares, incineração de resíduos urbanos e industriais e, principalmente, mineração, fundição e refinamento, tanto nas regiões urbanas como na zona rural são as principais fontes antropogênicas de metais no ambiente. Existe uma demanda e produção crescente de muitos metais nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Tal fato sugere um aumento das probabilidades de sua dispersão e contato com diversos compartimentos ambientais. Um metal pode ser dispersado desde o momento da extração de seu minério, durante o tempo que constitui produto utilizável, até depois que o produto é descartado, reciclado ou destruído. Em outras palavras, o homem está transformando parte dos metais imobilizados nos depósitos em metais mobilizados no ambiente. Esta situação se agrava nos países em desenvolvimento, para onde são exportadas fabricas mais poluidoras, dentro da lógica da divisão de trabalho internacional. Para agravar ainda mais o problema, nesses países os cuidados de controle de poluição industrial quase sempre não são adotados, equipamentos de abatimento de emissões nem sempre são instalados ou operados corretamente e a fiscalização é precária (TAVARES; CARVALHO, 1992).

Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns ditos metais pesados, incluindo o cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio e zinco, para a realização de funções vitais no organismo. Porém, níveis excessivos desses elementos podem ser extremamente tóxicos. Outros metais pesados, como mercúrio, chumbo e cádmio, não possuem nenhuma função dentro dos organismos e sua acumulação pode provocar graves doenças, sobretudo nos mamíferos (CAMPOS, 2009).

Os organismos vivos podem bioacumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas

aquáticos (VIARENGO, 1989). Quando se avalia genotoxicidade em peixes, metais são um grupo de elementos bastante interessantes em se trabalhar, devido ao seu forte impacto na estabilidade de ecossistemas aquáticos e sua bioacumulação em organismos vivos (TARIFENO-SILVA et al., 1982).

METAIS LÁBEIS

Os metais pesados, largamente utilizados pela indústria, normalmente, não se encontram como íons livres ou em sua forma original no ambiente, mas ocorrem como parte de espécies químicas que são resultantes de uma série de processos naturais biogeoquímicos, associados ou não às interferências humanas (MERIAN, 1991). Isso significa que as diversas espécies de um mesmo elemento apresentam comportamentos diferenciados, o que pode comprometer a exatidão do método durante sua determinação (VELA et al., 1993; GERVASIO et al., 2003).

A partição de metais entre as fases dissolvida e particulada exerce uma influência importante sobre seu transporte, reatividade e biodisponibilidade para a biota aquática. Mais do que isso, sabe-se hoje que a toxicidade de metais não pode ser atribuída, exclusivamente, à concentração total dissolvida. Consequentemente, o conhecimento da especiação química de metais é um aspecto determinante na avaliação de seu verdadeiro impacto ambiental (ALLEN; HANSEN, 1996).

Uma variedade de ligantes orgânicos e inorgânicos exerce um papel fundamental no controle da partição e da especiação de espécies metálicas em sistemas aquáticos (ALLEN; HANSEN, 1996; GRASSI et al., 2000). Uma das principais propriedades destes ligantes é a capacidade de formar complexos estáveis com metais e, em virtude disso, reduzir o potencial tóxico destas espécies (GUO et al., 2001). No material particulado em suspensão, estes ligantes compreendem uma grande variedade de compostos, geralmente, minerais, partículas orgânicas incluindo substâncias húmicas, microorganismos e tecidos biológicos e partículas inorgânicas cobertas por material orgânico (SHI et al., 1998; GRASSI et al., 2000). Na fração dissolvida, os principais compostos responsáveis pela complexação de espécies metálicas são os compostos orgânicos em solução, principalmente as substâncias húmicas aquáticas (SODRÉ et al., 2004).

A especiação de metais em águas naturais consiste em aspecto chave no subsídio da previsão do seu comportamento geoquímico e de sua biodisponibilidade. Conseqüentemente, fornece informações importantes para avaliação do real impacto associado à presença dessas espécies em ambientes aquáticos. Em sua maioria, as análises de especiação de metais em águas naturais buscam um maior entendimento sobre o comportamento destas espécies, identificando e frequentemente quantificando os agentes que governam a distribuição de metais na coluna de água e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade (SCHEFFER et al., 2007).

No caso específico do cobre, sua especiação em águas naturais é influenciada por fenômenos físico-químicos, tais como a complexação por ligantes orgânicos e inorgânicos, a adsorção por oxi-hidróxidos metálicos e argilominerais e as reações de troca que ocorrem na interface água-sedimento (WARREN, 2001). A interação do cobre com a matéria orgânica dissolvida ou com o material particulado em suspensão, por exemplo, levam à formação de espécies ditas não biodisponíveis do metal (STUMM, 1996; CAMPBELL, 2007).

CLORETO DE COBRE

O cobre é um micronutriente para a vida, presente em todos os ambientes aquáticos naturais e sedimentos. Esse metal é essencial para, virtualmente, todos os organismos vivos. O fluxo natural de concentrações de cobre levou a adaptação de muitos organismos aquáticos influenciando na composição, diversidade e abundância das populações. Invertebrados e peixes possuem um elaborado mecanismo homeostático para manter a concentração desse metal dentro de limites restritos, enquanto que a concentração externa pode flutuar entre diversas ordens de magnitude. Peixes utilizam proteínas chamadas de metalotioneínas que estão envolvidas no transporte e metabolismo do cobre (HALL; ANDERSON, R. D., 1999).

No entanto, esse metal pode se tornar tóxico quando sua concentração aumenta acima de certos limites naturais, promovendo danos à maquinaria protéica intracelular. A contaminação de corpos de água doce pode ser devida a mineração, agricultura e atividades manufactureiras, e concentrações de cobre dissolvido entre 50 µg/L e 560 µg/L já foram encontradas (IPCS, 1998; WHO, 1998, US EPA, 2007).

Para testes de ecotoxicidade, é comum o uso de diferentes sais (sulfatos, nitratos e cloretos, por exemplo). Em geral, apenas a concentração do cátion cobre é considerada como

tendo efeito sobre o organismo teste (DE LAENDER et al., 2005). No entanto, o uso de diferentes sais (sulfato e cloreto, por exemplo) resultarão em diferentes concentrações de ânions. Por exemplo, para cada mol de cobre, o cloreto de cobre dará dois mols de cloreto, e o sulfato de cobre resultará em um mol de sulfato. Como ficou demonstrado, os íons de sulfato ou de cloreto podem influenciar no resultado da toxicidade do cobre em organismos aquáticos (DE LAENDER et al., 2005). Os ânions dos sais de cobre podem afetar o resultado do teste por ter um efeito direto sobre o organismo utilizado ou indireto por interação com o cátion cobre, influenciando sua biodisponibilidade (KWOK et al., 2008).

O cobre é considerado um dos metais mais tóxicos para peixes (MATSUO et al., 2005). Quando em concentrações elevadas, resulta em várias disfunções no organismo, tais como diminuição no ganho de peso, menor crescimento, piora na conversão alimentar, aumento dos ovos, elevada morte de embriões, alterações histopatológicas no fígado e brânquias, além de distúrbios hematológicos e na regulação iônica. É considerado, quando em conjunto com o ferro, como catalisador de reações em que os radicais livres formados oxidam lipídios insaturados, tendo efeito direto na estrutura e na função da membrana das células (FERRARI, 2004; NUNES et al., 2010).

Entre outras desordens, anormalidades na função reprodutiva masculina têm sido reportadas. Estudos em trabalhadores expostos a solda elétrica revelam que a quantidade de cobre no sêmen aumenta enquanto que a contagem de espermatozoides, viabilidade e volume do sêmen diminuem (WU, 1996). Tem sido reportado que um longo período de ingestão de cloreto de cobre afeta adversamente o comportamento sexual, fertilidade e peso dos testículos e órgãos sexuais acessórios de ratos machos adultos (BATAINEH, 1998). Exposições crônicas de ratos a vapor de cloreto de cobre causaram diminuição da concentração de FSH, LH e testosterona no plasma, além de disfunções nas gônadas e na espermatogênese (GABUCHYAN, 1987).

CHATTOPADHYAY et al., (2005) realizaram um experimento com ratos Wistar jovens (com idade entre 30 e 35 dias), que durou 24 dias, encontraram que atividade da enzima testicular 17 β -HSD (Hidroxiesteróide desidrogenase), nível sérico de testosterona e LH aumentam significativamente com uma dose de 1000 μ g/kg/dia de cloreto de cobre e diminuem significativamente nas doses de 2000 e 3000 μ g/kg/dia. Esses resultados também foram obtidos quanto ao peso testicular e número de células germinativas, que tiveram um aumento na menor dose e diminuição significativa nas maiores concentrações.

O efeito genotóxico do cloreto de cobre também é relatado para plantas. INCEER; BEYAZOĞLU, (2000), avaliaram o efeito genotóxico do cloreto de cobre sobre células de radícula de *Vicia hirsuta* (Unha-de-gato) nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 mg/L em períodos de 4, 12, 24 e 48 horas. Eles encontraram que o número de aberrações cromossômicas aumentam e o índice mitótico diminui de acordo com a concentração do contaminante e o tempo de exposição. Também, INCEER et al., (2003), colocaram sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) em placas de petri contendo doses de 10, 20, 50 e 100 mg/L de cloreto de cobre diluídos em água destilada. As sementes eram deixadas na solução teste por um período de 24h e depois um pedaço da radícula era retirado e submetido a uma análise citogenética onde se observava o índice mitótico e a porcentagem de células anormais em prófase, metáfase e ana-telófase. O cloreto de cobre causou um decréscimo na taxa mitótica em todas as concentrações e a porcentagem de células anormais aumentou conforme a concentração do xenobionte aumentava

Efeitos deletérios do cobre podem não ser aparentes até que ocorram alterações em níveis populacionais, e assim, poderá ser tarde demais para se tomar contramedidas. De acordo com isso, é necessário desenvolver bioensaios rápidos de toxicidade capazes de mostrar esse potencial toxicológico. As alterações subletais, em nível molecular, podem servir como indicadores precoces do impacto do contaminante (LANGSTON et al., 2002).

BIOMARCADORES

Por volta dos anos 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram e, a partir daí, foram desenvolvidos os primeiros testes rápidos e eficientes que são empregados em estudos de genotoxicidade (VILLELA, 2003).

Respostas biológicas a agressões ambientais podem ser evidenciadas em diversos níveis de organização, desde ecossistemas até compartimento subcelulares ou reações químicas intracelulares, passando por comunidades, populações, organismos, fisiologia e células (WALKER, 1997)

Alterações na estrutura e função dos ecossistemas são as formas mais relevantes do ponto de vista ecológico para avaliar toxicidade de contaminantes sobre o ambiente (KELLY; HARWELL, 1989). No entanto, quando uma alteração significativa é observada no ecossistema, este já sofreu danos muito severos, e é impossível relacionar concentrações de poluentes a determinados graus de alterações ambientais (NASCIMENTO, PEREIRA e LEITE, 2006).

Os efeitos iniciais causados pelos poluentes são observados nos níveis organizacionais mais básicos, nas respostas bioquímicas e moleculares. Nesse estágio de contaminação as alterações causadas pelos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente. Dessa forma, devem ser utilizados marcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos capazes de indicar diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT, 1992).

Dentre os principais testes de genotoxicidade, podemos citar os de avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, ensaio cometa e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL et al., 2001).

TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

A observação de que danos cromossômicos podem ser causados por radiação ionizante ou por substâncias químicas cancerígenas foi uma das primeiras evidências confiáveis de que agentes físicos ou químicos podem ser causadores de grandes alterações no material genético de células eucarióticas (EVANS, 1977).

Embora nossos conhecimentos sobre a estrutura dos cromossomos sejam incompletos, evidências sugerem que anomalias cromossômicas sejam uma consequência direta e uma manifestação do dano ao nível de DNA (SAVAGE, 1993). Sabe-se também que a perda de cromossomos e não disjunção são importantes eventos no câncer e no envelhecimento e que são provavelmente causados por defeitos no fuso, centrômero ou em função do grau de condensação do cromossomo antes da metáfase (EVANS, 1990; DELLARCO, 1985; GUTTENBACH, 1994).

Nas técnicas de citogenética clássica é feita a observação e contagem de aberrações cromossômicas nas metáfases, no entanto esse trabalho é complexo e podem ocorrer artefatos pela preparação das lâminas. Isso estimulou o desenvolvimento de sistemas mais simples de se avaliar danos cromossômicos (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo foi inicialmente proposto, independentemente, por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975) como uma alternativa as técnicas citogenéticas clássicas para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* em populações de células em divisão, como as da medula óssea (FENECH, 2000). Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal depois da anáfase (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Micronúcleos abrigam fragmentos cromossômicos resultantes de, por exemplo: A) quebras diretas no DNA; B) replicação à partir de uma fita molde danificada; e C) inibição da síntese de DNA. Micronúcleos que abrigam cromossomos inteiros são formados principalmente por falhas no fuso mitótico, cinetocoro, ou outras partes do aparato mitótico ou por danos cromossômicos sub-estruturais, alterações na fisiologia celular e ruptura mecânica. Assim, um aumento da frequência de células micronucleadas é um marcador de efeitos genotóxicos, que pode refletir uma exposição a agentes com modo de ação clastogênicos (quebra de cromossomos; quando o DNA é alvo do agente químico) ou aneugênicos (efeito no número de cromossomos, na maioria dos casos, o DNA não é alvo do químico) (ALBERTINI et al., 2000).

Modificando o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos, HOOFTMAN; DE RAAT (1982) introduziram o ensaio nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO; TYLBURY; MYERS, 1990). Para HOSE et al. (1987) este teste revelou grandes potencialidades por ser de rápida execução, não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química dos peixes. Desde o início de seus trabalhos, com o teste do micronúcleo com peixes HOOFTMAN e DE RAAT (1982), fizeram observações sobre alterações morfológicas nos núcleos eritrocitários, os quais normalmente são elípticos, mas que em alguns casos perdiam esta forma usual.

HOSE et al. (1987) relataram várias alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos circulantes. Assim como os micronúcleos, a frequência das alterações morfológicas nucleares apresentavam diferenças significativas entre os grupos coletados em regiões poluídas e os grupos coletados em regiões não poluídas (controle), em duas espécies de peixes marinhos. Os autores sustentaram, em seu trabalho, que estas alterações morfológicas nucleares eram indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água. Consideraram ainda que estas alterações seriam possíveis de serem incluídas nas contagens dos micronúcleos realizadas em seu trabalho. Estes autores concluem ainda que o teste do micronúcleo seria aplicável a qualquer espécie de peixe, independente de suas características cariotípicas (CARRASCO; TYLBURY; MYERS, 1990).

Em peixes, diversos tipos de lesões nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Apesar de não encontrar uma relação significativa entre a presença de algumas alterações na morfologia do núcleo (incluindo os micronúcleos) e a presença de poluentes químicos no sedimento e em tecidos de peixes (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001). CARRASCO; TYLBURY; MYERS (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente classificadas em (Figura 02):

a) *Blebbled*: pequena evaginação da membrana nuclear. O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, porém ainda ligadas ao núcleo.

b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbled*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos no seu interior. Estes vacúolos apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ (2001), realizaram um experimento a fim de avaliar se as alterações morfológicas nucleares descritas por CARRASCO; TYLBURY; MYERS (1990), e também a presença de micronúcleos, em eritrócitos poderiam ser resultantes de atividades tóxicas de xenobióticos. Para isso, os autores expuseram exemplares de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a diversos químicos indutores de efeitos aneugênicos e clastogênicos. Tais autores demonstraram que compostos fortemente clastogênicos, tais como a ciclofosfamida e a mitromicina C, induzem a formação de anomalias nucleares. Colchicina, ciclofosfamida, acrilamida e N-ethyl-N-nitrosourea induziram a formação de micronúcleos. Em um trabalho anterior, de 2000, os mesmos autores já haviam demonstrado resultados similares, sugerindo que alguns compostos podem agir formando anormalidades nucleares, porém sem a formação de micronúcleos. Seus resultados dão suporte ao uso testes de anormalidades nucleares (incluindo micronúcleos) em eritrócitos de peixes como um modelo sensível para se avaliar a capacidade citotóxica de compostos químicos sob condições laboratoriais.

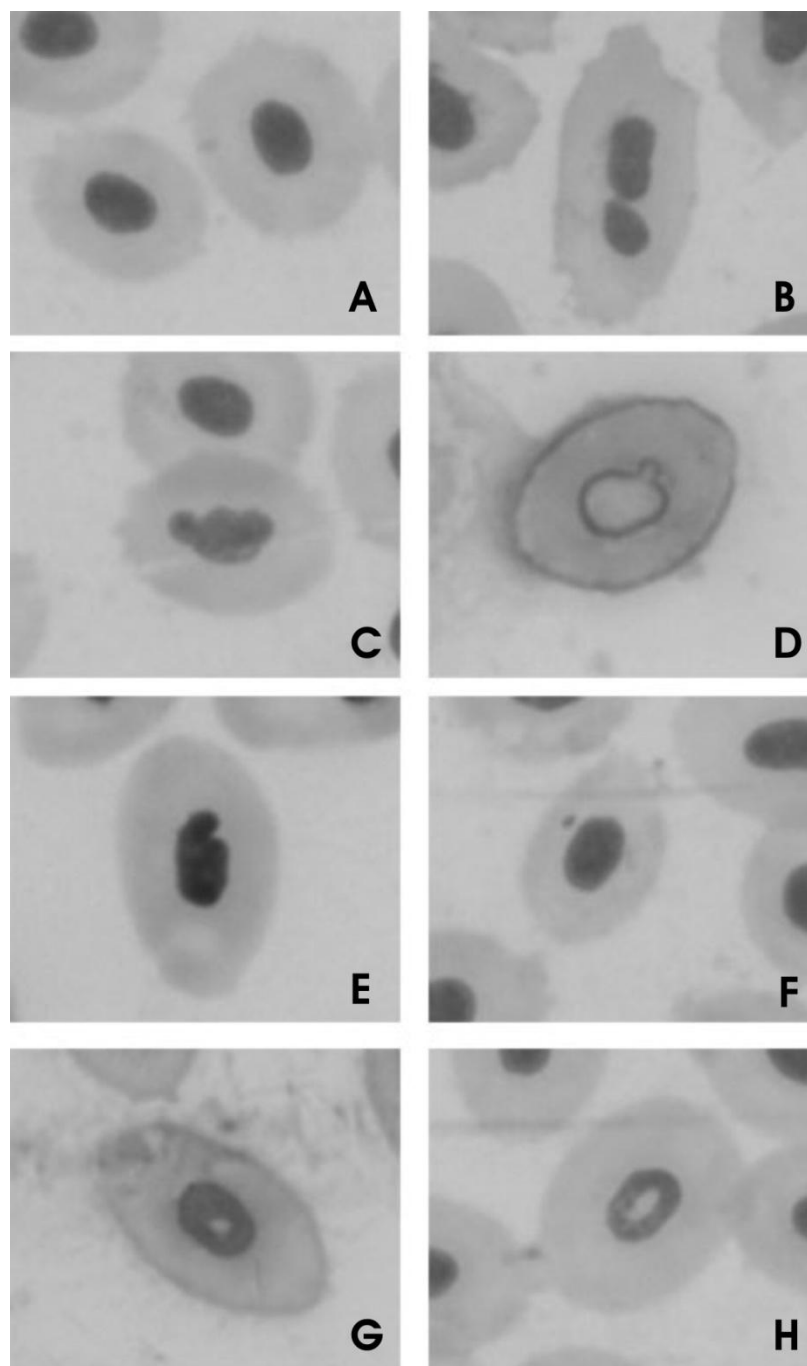


Figura 02 – Micronúcleo e alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao CuCl₂. (A) Células normais; (B) binúcleo; (C) *Lobed*; (D) *Blebbed*; (E) *Notched*; (F) Micronúcleo e (G-H) Vacuolos.

ENSAIO COMETA

Os danos mais importantes a nível molecular são, sem dúvida, os vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo as quebras, que são facilmente visualizadas através do ensaio cometa (JHA, 2008).

RYDEBERG; JOHANSON (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente danos ao DNA de células isoladas utilizando a técnica de eletroforese em microgel. OSTLING; JOHANSON (1984) modificaram a técnica de modo que a eletroforese fosse realizada sob condições neutras. Essa modificação permitia apenas a detecção de quebras de dupla-fita ao DNA (PANDRANGI et al., 1995). SINGH et al. (1988) realizou a eletroforese sob condições alcalinas, resultando no desenrolamento da molécula de DNA e expondo sítios álcali-lábeis. Essa modificação permitiu a detecção de quebras em fita simples e modificações de sítios álcali-lábeis em virtualmente qualquer célula eucariótica (PANDRANGI et al., 1995). Já bem estabelecido, o ensaio cometa é simples, versátil, rápido, visual, e um instrumento sensível e largamente utilizado para avaliar os danos e reparo do DNA tanto quantitativa como qualitativamente, em populações de células individuais (OLIVE; BANATH 2006; DHAWAN et al., 2009).

O ensaio cometa (Figura 03), ou SCGE (*Single-cell gel electrophoresis*) estabeleceu-se como uma técnica muito útil para estudos envolvendo quebras e reparo de DNA. Nessa técnica de eletroforese em microgel, um pequeno número de células suspensas em um fino gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia são lisadas, submetidas a eletroforese e marcadas com corante fluorescente DNA ligante. Nas células que apresentam mais quebras no DNA, ocorre migração do DNA cromossômico a partir do núcleo em direção do ânodo, fazendo lembrar a forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999).

Outras metodologias tais como os testes de micronúcleo, de aberrações cromossômicas ou de trocas de cromátides irmãs, necessitam de células mitoticamente ativas para sua viabilidade, já o ensaio cometa não necessita desta condição, podendo, virtualmente, ser utilizado em qualquer tipo de célula (PANDRANGI et al., 1995).

O atual consenso científico é de que o ensaio é simples, rápido, de baixo custo e sensível. No entanto uma das principais críticas a técnica, é a de que as quebras ao DNA podem não estar relacionadas a uma exposição específicas, diferentemente do que ocorre com a formação de adutos de DNA, que estão diretamente relacionados a presença de poluentes específicos. Porém, a relativa simplicidade do ensaio cometa quando comparado as

sofisticadas técnicas de determinação de adutos de DNA fazem com que o teste seja uma ferramenta interessante para se avaliar danos globais a molécula de DNA (BELPAEME et al., 1998).

Em muitos casos, é característica nos peixes um cariótipo constituído de muitos cromossomos de tamanho pequeno. Visto que para a realização do ensaio cometa não é necessário o conhecimento do número ou forma dos cromossomos, este teste tem grande potencial para determinar danos ao DNA de peixes (BELPAEME et al., 1996).

Eritrócitos e linfócitos do sangue são mais comumente utilizados para a realização do teste porque são de fácil obtenção e não é necessário fazer dissociação celular. No entanto, outros tecidos, como fígado, brânquias e rins podem também ser utilizados (BELPAEME et al., 1998).

Algumas outras lesões ao DNA, com ligações cruzadas de DNA (por exemplo, os dímeros de timina) e danos oxidativos à molécula podem ser avaliadas no ensaio cometa através de anticorpos lesão-específicos ou enzimas específicas de reparo ao DNA. Ele ganhou ampla aceitação como uma valiosa ferramenta em estudos de genotoxicidade, reparo e biomonitoramento humano (DHAWAN et al., 2009).

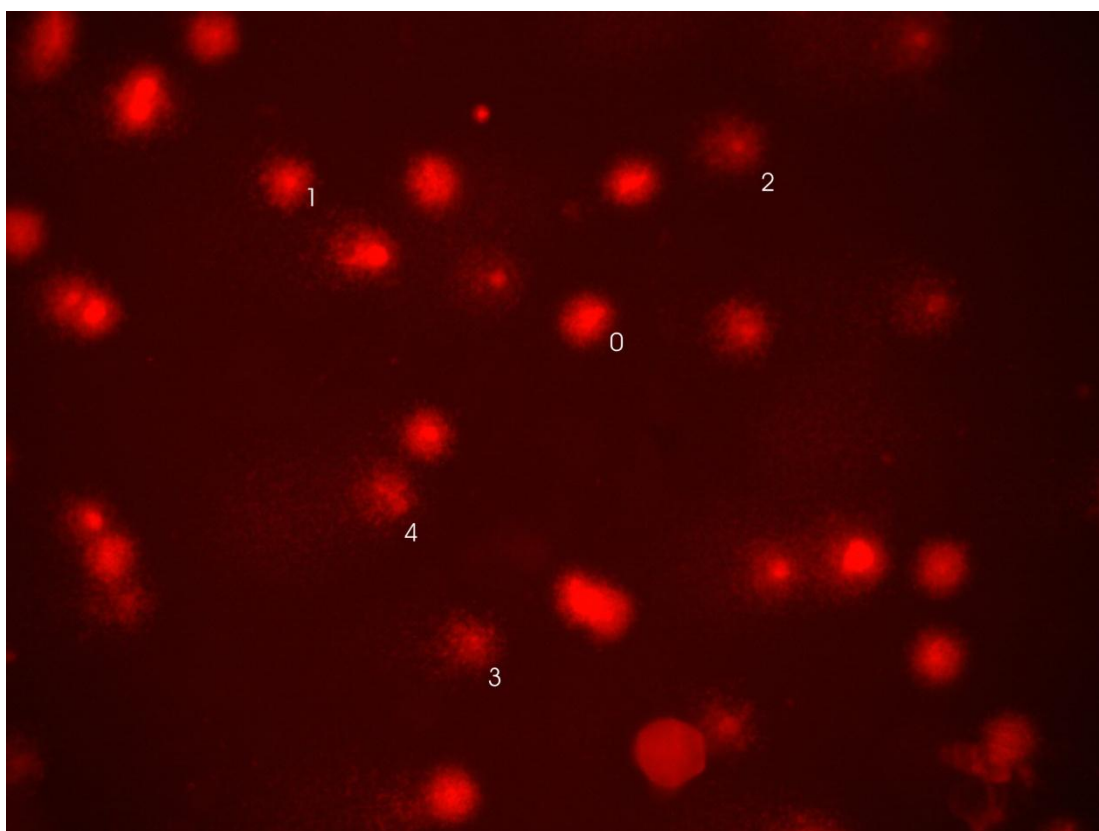


Figura 03 – Cometas de eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos à 18 µg/L de Cloreto de Cobre (II) observados com aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. Classificação de acordo com KOBAYASHI, 1995, sendo classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). Fonte: O autor.

BIOINDICADORES

Tradicionalmente, os poluentes lançados direta ou indiretamente nos corpos d'água são mais reconhecidos por suas características físico-químicas. A noção clássica de contaminação envolve a presença de substâncias potencialmente nocivas nas águas, e a determinação da presença e concentração destes elementos muitas vezes é fundamentada quase que exclusivamente em avaliações físico-químicas baseadas no reconhecimento de poluentes específicos em pontos amostrais determinados. Desconsidera-se, assim, o seu efeito nas comunidades aquáticas bem como a capacidade que os organismos vivos têm de atuar ativamente na manutenção do equilíbrio geral do ecossistema impactado (PIANCINI, 2008).

Diante disto, nas últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA et al., 2003). Este interesse foi intensificado em razão do constante crescimento populacional e o consequente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais. Para tanto, águas e sedimentos podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas (MINISSI et al., 1996). A avaliação da toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é feita por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

ASPÉCTOS ECOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen*

REINO – Animalia

FILO – Chordata

SUBFILO – Vertebrata

SUPERCLASSE – Gnathostomata

CLASSE – Actinopterygii

SUBCLASSE – Neopterygii

DIVISÃO – Teleostei

SUBDIVISÃO – Ostarioclupeomorpha

SUPERORDEM – Osthariophysi

SÉRIE – Otophysi

ORDEM – Siluriformes

SUPERFAMÍLIA – Heptapteroidea

FAMÍLIA – Heptapteridae

GÊNERO – *Rhamdia*

ESPÉCIE – *Rhamdia quelen*

Essa família é equivalente à anteriormente descrita com Rhamdiinae (colocada em Pimelodidae com os gêneros enumerados por LUNDBERG *et al.*, 1991) e adicionado a Heptapteridae por DE PINNA em 1996. A diversidade desse grupo é pobremente conhecida e estima-se que aproximadamente 50 espécies ainda devem ser descritas (NELSON, 2006)

Os membros da família Heptapteridae apresentam pele sem escamas, três pares de barbilhões, nadadeira adiposa grande e nadadeira caudal profundamente bifurcada. Essas características não são exclusivas dessa família e nem sempre seus membros podem ser distinguidos dos membros da antiga família Pimelodidae por características externas (NELSON, 2006).

O Jundiá, nome popular dado a espécie *Rhamdia quelen* (Figura 03), tem distribuição neotropical, do sudeste do México, ao norte, e centro da Argentina, ao sul (SILFVERGRIP, 1996). A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita. Em 1996 SILFVERGRIP realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero, baseada em caracteres da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado por apenas 11 espécies dentre 100 anteriormente descritas (GOMES *et al.*, 2000).

Rhamdia quelen vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980).

Segundo SILFVERGRIP (1996), a coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia e *R. quelen* pode ser diferenciado das outras espécies de *Rhamdia* através das seguintes características: espinho da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados; nadadeira caudal com lóbulos desiguais; com ou sem poros sensoriais múltiplos na cabeça; véu da narina posterior aberta postero-lateralmente, barbilhões maxilares no mínimo 28,8% do comprimento padrão; arcos branquiais de 5 a 16; vértebras pós Weberianas de 36 a 44; olhos de tamanho médio, com ou sem padrão de manchas; com ou sem uma marca tipo selim escuro na nuca.



Figura 03 – Exemplares de Jundiá (*Rhamdia quelen*).

Fonte: O autor.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Devido ao grande consumo do herbicida atrazina no Brasil e no mundo, e à presença do metal cobre, principalmente em ambientes aquáticos, faz-se necessário testar os efeitos desses poluentes sobre o DNA de uma espécie de peixe neotropical (*Rhamdia quelen*). Estes testes genotóxicos se fazem necessários visto serem considerados biomarcadores de efeitos precoces, além de que danos no DNA de uma espécie de peixes pode nos levar a supor um futuro comprometimento da comunidade como um todo.

OBJETIVO GERAL

Avaliar se ocorrerá genotoxicidade em espécimes de *Rhamdia quelen* submetidos aos xenobiontes cloreto de cobre (metal) e da atrazina (agrotóxico) em bioensaios por via hídrica. e de forma aguda, nos modelos experimentais estático e semi-estático.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar se ocorrerá genotoxicidade, em 3 concentrações do cloreto de cobre, utilizando o teste de micronúcleo písceo em eritrócitos e ensaio cometa alcalino em eritrócitos e células das brânquias de *Rhamdia quelen*;
- Através de parâmetros químicos de quantificação do cobre nos aquários, estimar a relação entre danos ao material genético, dos tecidos já citados, e a concentração biodisponível do cobre aos peixes.
- Avaliar se ocorrerá genotoxicidade, em 3 concentrações da atrazina, utilizando o teste de micronúcleo písceo em eritrócitos e ensaio cometa alcalino em eritrócitos e células das brânquias de *Rhamdia quelen*;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta dissertação estão apresentados na forma de dois capítulos, os quais correspondem a artigos científicos em fase de preparação para publicação. Tabelas complementares contendo informações detalhadas a respeito de dados gerais sobre os animais utilizados, escores obtidos pelo ensaio cometa e frequência de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos, podem ser consultados na sessão de anexos.

As referências bibliográficas, tanto da introdução geral da dissertação quanto dos capítulos estão reunidas no final deste trabalho.

CAPÍTULO I

Avaliação do herbicida Atrazina através do teste do micronúcleo písceo e do ensaio cometa em eritrócitos e brânquias de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)

Resumo

A utilização de agrotóxicos é o meio mais eficaz e aceito para a proteção de culturas agrícolas, e tem contribuído significativamente para o aumento da produtividade. Pesticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos causando sérios problemas à biota aquática. Atrazina (ATZ) é um herbicida de baixo custo e grande efetividade, e por isso é um dos mais utilizados por todo o mundo. Através do teste do micronúcleo písceo (MNP) e do ensaio cometa em eritrócitos (ECE) e brânquias (ECB), o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos da ATZ sobre *Rhamdia quelen* em três diferentes concentrações: 2, 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em experimentos estático e semi-estático de 96 horas. No modelo estático, observamos aumento da frequência de alterações morfológicas nucleares em todas as concentrações. Também notamos um aumento dose-dependente do efeito da ATZ sobre o DNA do ECE, sendo que as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ tiveram danos significativamente superiores ao controle, e a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ manteve-se intermediária em relação ao controle e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em brânquias não ocorreu diferença entre os tratamentos. No experimento estático, não observamos diferenças significativas pelo MNP, no entanto o ECE evidenciou aumento de quebras na concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e o ECB mostrou maiores danos ao DNA dos peixes expostos a 2 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao controle e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nossos resultados mostram um efeito dose-dependente da atrazina em relação a genotoxicidade. ATZ é capaz de causar danos ao DNA de *R. quelen* mesmo na concentração considerada segura pela legislação brasileira.

Abstract

The pesticides use is the most effective and accepted way for protecting agricultural crops, and has significantly contributed to the increasing of productivity. Pesticides can reach aquatic ecosystems causing serious problems for aquatic biota. The Atrazine (ATZ) is a low cost and great effectiveness herbicide, and because of these is one of the most used around the world. Through the piscine micronucleus test (MNP) and the comet assay in erythrocytes (ECE) and gills cells (ECB), the aim of this study was to evaluate the genotoxic effects of ATZ on *Rhamdia quelen* in three different concentrations: 2, 10 and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in static and semi-static experiments during 96 hours. In the static model, we observed an increased frequency of nuclear morphological changes at all concentrations. We also noted a dose-dependent effect of ATZ on DNA through the ECE, considering that on 10 and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ concentrations were significantly higher than damage control, and the 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ concentration was intermediate in the control and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In gills, there was no difference between treatments. In the statics experiment, there was no significant differences by NPM, but the ECE showed an increase of breaches in the 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, and the ECB showed higher DNA damage on fish exposed to 2 and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ than in the control and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Our results show a dose-dependent effect of atrazine in relation to genotoxicity. ATZ is capable of causing damage to DNA of *R. quelen* although on the concentration considered safe by the Brazilian legislation.

Introdução

Os agrotóxicos são biocidas por natureza, ou seja, são venenos utilizados na agricultura para exterminar formas de vida que constituem pragas para alguma cultura. Assim, não há agrotóxicos inofensivos. No entanto, nesse diversificado grupo de compostos químicos, alguns são extremamente agressivos ao ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005).

Eles constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas projetados especificamente para o controle de pragas, ervas daninhas ou doenças de plantas. A sua aplicação ainda é o meio mais eficaz e aceito para a proteção de culturas contra pragas, e tem contribuído significativamente para o aumento da produtividade agrícola e maior rendimento das culturas (BOLOGNESI, 2003). Esses pesticidas podem atingir os ecossistemas aquáticos intencionalmente ou indiretamente através de lixiviamento do solo à partir das áreas onde são aplicados (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

A atrazina é utilizada desde os anos 50, em culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo, soja, entre outras culturas de folhas largas. Ela é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, com estimativas de aplicação entre 70.000 e 90.000 toneladas por ano. Devido ao seu baixo custo e grande efetividade, ela é mais comumente utilizada que os outros herbicidas no mundo (AZEVEDO et al., 2004).

Nas últimas duas décadas diversos estudos têm levantado dúvidas quanto a toxicidade da atrazina sobre diversos organismos. concentrações extremamente baixas de ATZ causaram hermafroditismo em anfíbios (HAYES et al., 2002a; 2002b; 2003) e efeitos adversos na reprodução de peixes foram observado (TILLITT et al., 2010; (SALABERRIA et al., 2009). A ativação do complexo enzimático do citocromo P450, envolvido no processo de detoxificação, por atrazina foi observado em *Danio rerio* (DONG et al., 2009; JIN et al., 2010) e larvas do mosquito *Chironomus tentans* (MIOTA et al., 2000), além de alterações na expressão de enzimas envolvidas nesse processo, foi também observado em carpas (CERICATO et al., 2009; XING et al., 2010a; XING et al., 2010b), minhocas (SONG et al., 2009), e linfócitos humanos, *in vitro* (LIOI et al., 1998). Efeitos genotóxicos foram observados em plantas (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009), minhocas (SONG et. al., 2009), peixes (MORON et al., 2006; NWANI et al., 2010; VENTURA et al., 2008), culturas de linfócitos humanos (LIOLI et. al., 1998) e medula óssea de camundongos (TENNANT et al.,

2001). Também foi observado alterações comportamentais causadas por atrazina em *Carassius auratus* (SAGLIO; TRIJASSE, 1998).

Peixes e invertebrados aquáticos podem acumular pesticidas em concentrações muito superiores às encontradas nas águas onde vivem, porque esses produtos químicos podem passar por bioacumulação ou ligar-se ao material particulado em suspensão, que por sua vez podem ser ingeridos por organismos presentes no ambiente (NIMMO, 1985)

O conhecimento da toxicidade dos agentes químicos a diferentes organismos aquáticos possibilita, além do estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática, avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam a biota. Dependendo das características físicas e químicas da substância-teste, bioensaios podem ser realizados de maneira estática ou semi-estática. (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006): No modelo estático os organismos são expostos a mesma solução durante o período do experimento. Apesar da facilidade na execução desse tipo de experimento, alguns problemas, como a diminuição da concentração teste, podem ocorrer. No modelo semi-estático, há troca parcial da solução-teste através da remoção de parte da solução e reposição, na mesma concentração desejada (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006):

O teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem sido usado como uma das principais ferramentas na avaliação do potencial clastogênico de diferentes compostos no ambiente aquático. Diversos estudos vêm mostrando que em eritrócitos de peixes a frequência de micronúcleos, bem como outras alterações morfológicas nucleares, aumentam quando os organismos são expostos a diferentes poluentes tanto em bioensaios (GHISI et al., 2010; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; RAMSDORF et al., 2009a; VENTURA et al., 2008) como em trabalhos de campo (DE FLORA et al., 1993; ERGENE et al., 2007; KATSUMITI et al., 2009).

O ensaio cometa é uma técnica já estabelecida há mais de 20 anos, que permite avaliar quebras ao DNA de células em, virtualmente, qualquer tecido. Esse teste é mais comumente aplicado em células sanguíneas porque amostras são mais fáceis de serem obtidas e não é necessário a dissociação celular (BELPAEME et. al., 1996). No entanto, outros tecidos, como as brânquias podem ser utilizados (DEVENTER, 1996), principalmente por esse tecido estar em contato direto com o contaminante.

Nós investigamos o potencial genotóxico do herbicida atrazina em bioensaios com os sistemas estático e semi-estático, utilizando como bioindicador a espécie *Rhamdia quelen*

(Jundiá), Para tal, as metodologias empregadas foram o teste do micronúcleo písceo e o ensaio cometa em células branquiais e sanguíneas.

Material e métodos

Preparação da solução teste

Atrazina (98,8 %, Sigma-aldrich) foi diluída em água destilada à temperatura de 22 °C em uma concentração de 0,032 g.L⁻¹. A partir desta solução foi adicionada a cada aquário a quantidade necessária de solução para se chegar as concentrações teste.

Desenho experimental

Os espécimes de Jundiá (*Rhamdia quelen*: 23,04 ± 13,07 g) foram adquiridos em uma piscicultura na cidade de Toledo-PR, cujo número da licença de operação fornecida pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) é 16624. Os peixes foram aclimatados por 30 dias em tanques de 250 L de água filtrada com aeração constante e temperatura média de 26 °C, fotoperíodo de 12 horas e alimentação diária. Uma semana antes do início dos experimentos, oitenta jundiás eram divididos aleatoriamente entre quatro aquários (20 animais por tratamento) de 108 L de água filtrada com condições semelhantes aos tanques de adaptação. Desses aquários, um destinou-se ao grupo controle negativo (CTL) e três para os grupos teste: 2, 10 e 100 µg.L⁻¹ de ATZ.

Experimento estático

Nesse modelo experimental não ocorreu troca de água de nenhum dos aquários durante o período de 96 horas de exposição. Os peixes foram alimentados somente duas vezes durante o experimento, uma vez no início do período de contaminação e a segunda 48 horas antes do término do bioensaio.

Experimento semi-estático

Da mesma forma que no experimento anterior, os peixes foram expostos ao xenobiótico por um período de 96 horas, no entanto no modelo semi-estático foi realizada a troca de 1/3 da água dos aquários a cada 24 horas, inclusive no grupo controle. Após a retirada de parte da água do aquário foi feita a reposição do contaminante correspondente a

1/3 da concentração teste de cada grupo, e logo após voltou-se o nível de água ao volume completo de cada aquário. Foi necessário fazer a troca de água também no grupo controle para que não houvesse interferência do estresse causado pelo processo de reposição de água nos resultados do experimento. Os peixes foram alimentados a cada 24 horas, sofrendo restrição alimentar nas últimas 24 horas para o término do bioensaio.

Teste do Micronúcleo Písceo

Para se verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por HOOFTMAN e RAAT (1982). As amostras de sangue foram coletadas por pulsão caudal com o auxílio de uma seringa heparinizada, após os peixes serem anestesiados (Benzocaína 10%). Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e imediatamente foi realizado o esfregaço, resultando em uma lâmina para cada animal. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e depois fixadas em etanol absoluto (Merck) por 30 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas em Giemsa (Merck) 10% diluída em tampão fosfato, pH 6,8. De cada lâmina foram analisadas 2000 células. Além dos micronúcleos, as alterações morfológicas nucleares também foram classificadas como indicativos de genotoxicidade de acordo com AYLLÓN e GARCIA-VAZQUEZ (2001).

Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com SPEIT; HARTMANN (1999). Para o ensaio cometa com eritrócitos (ECE), uma gota de sangue foi misturada a 1 mL de soro fetal bovino. O primeiro arco branquial do lado direito de cada peixe foi coletado, para realização do ensaio cometa com células branquiais (ECB), e então foi feita uma lavagem com PBS em placa de petri para retirar o máximo possível de sangue da amostra. Os filamentos branquiais foram separados do arco e então colocados em microtubo contendo 0,5 mL de soro fetal bovino e depois o tecido foi homogeneizado à ~15.000 rpm (Tecnal – TE-103). O material foi armazenado em geladeira por 24 horas antes da montagem das lâminas. Segundo (RAMSDORF et al., 2009b), o soro fetal bovino é a melhor solução para manter a viabilidade celular por até 48 horas.

A confecção das lâminas tanto para o ECE quanto para o ECB seguiram os mesmo passos após a coleta do sangue e a homogeneização do tecido branquial. 10 µL de suspensão celular foi misturado a 120 µL de agarose baixo ponto de fusão (LMP), essa mistura foi então

disposta sobre uma lâmina de microscopia, previamente coberta com uma fina camada de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL de PBS), coberta com uma lamínula e deixada no refrigerador por cerca de 15 minutos. Após esse tempo, a lamínula foi retirada e as lâminas foram colocadas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl, 2.5M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0.8%; N-lauryl-sarcosinate, 1%; solução de lise uso: 1 ml Triton X100; 10 ml DMSO; e 89 ml de solução de lise estoque) por 24 horas a 4 °C. Após, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, onde ficaram por 20 minutos imersas no tampão de eletroforese (300 mM NaOH/1 mM EDTA) com pH > 13 para que ocorresse o desenrolamento parcial do DNA. A eletroforese foi realizada a 300 mA, 25 V por 25 minutos e depois as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M de Tris, pH 7,5; fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e coradas com 20 µL de brometo de etídeo (10 µg.mL⁻¹). Os cometas foram classificados usando-se um microscópio de epifluorescência Zeiss. Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides (KOBAYASHI et al., 1995), usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA da seguinte forma: classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). Os escores foram calculados pela multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe.

Análise estatística

Para a comparação entre os diferentes grupos, tanto para o MNP quanto para ECE e ECB, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, sendo que para se comparar a média dos postos utilizou-se *Student-Newman-Keuls*. Para se comparar os resultados obtidos para sangue e células branquiais dentro dos diferentes grupos, foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. Quando comparados os experimentos, grupo a grupo, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram feitas pelo software Bioestat 5.0 (AYRES, 2007).

Resultados

Em ambos experimentos, estático e semi-estático, não ocorreu morte de animais durante as 96 horas de exposição à Atrazina.

Bioensaio estático

O MNP mostrou haver diferença estatística na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares entre o grupo controle e os grupos contaminados (CTL x 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0048$; CTL x 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0004$; CTL x 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0017$) , no entanto não houve diferença entre as concentrações testadas (2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ x 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,4907$; 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ x 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,8192$; 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ x 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,6342$) (Figura 01).

Já o ensaio cometa em eritrócitos revelou que havia mais danos ao DNA dos animais expostos as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao grupo controle ($p = 0,0011$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Os animais expostos a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não apresentaram diferença com relação ao controle ($p = 0,1241$) e nem com o grupo de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0846$) (Figura 02a).

Em células branquiais, o ensaio cometa mostrou diferença significativa entre o grupo controle e a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0071$) no entanto a mediana dos escores foi maior no grupo controle. Não houve diferença significativa entre controle e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,4631$), entre controle e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,8642$) e entre 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0500$) (Figura 02b).

Comparando-se os resultados obtidos no ensaio cometa para células sanguíneas e branquiais, pudemos observar que no grupo controle ocorreu maior dano ao DNA das células branquiais ($p = 0,0003$). Nos grupos expostos as concentrações de 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foi observado diferença significativa ($p = 0,3969$ e $p = 0,0727$, respectivamente), apesar dos escores obtidos para os eritrócitos apresentarem mediana superior aos escores do outro tecido. Já nos peixes expostos a concentração 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ocorreu diferença significativa entre os tecidos ($p = 0,0134$), sendo que os maiores escores foram observados nas hemácias (Figura 04).

Bioensaio semi-estático

No MNP, não ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e as concentrações-teste ($p = 0,0919$), através do teste de Kruskal-Wallis (Figura 04).

Nesse experimento, não foi possível realizar a análise nas lâminas do grupo de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nos eritrócitos, por problemas técnicos. Através do ECE foi observado que não houve

diferença significativa entre o grupo controle e a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,6354$), mas observa-se que os danos foram significativamente maiores no tratamento exposto a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ em relação ao grupo controle ($p = 0,0135$) (Figura 05a).

Os dados obtidos com células branquiais mostraram diferença significante entre o grupo controle e as três concentrações testadas CTL x 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0488$; CTL x 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0006$; CTL x 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $p = 0,0161$), no entanto, os escores obtidos para o grupo exposto a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram danos significativamente menores em relação aos demais grupos, inclusive o controle. Não foi observada diferença entre os danos ocorridos no grupo exposto a 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ ($p = 0,9302$) (Figura 05b).

Quando comparados os tecidos, observamos que nas brânquias ocorreram mais quebras no DNA em relação às hemácias, tanto no grupo controle ($p = 0,0005$) quanto no grupos de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0054$) (Figura 06). No grupo 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não observamos diferenças entre os tecidos ($p = 0,1719$), e na concentração 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não foi possível a comparação pela falta de dados para eritrócitos.

Na Tabela 01, podemos ver uma comparação entre as diferentes metodologias empregadas na exposição ao contaminante. Para brânquias, pudemos notar que ocorreu diferença entre os escores encontrados nos três grupos expostos a ATZ, sendo que os danos causados aos peixes no experimento semi-estático foram superiores nas concentrações de 2 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e menores no experimento semi-estático para a concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os danos causados ao DNA dos eritrócitos foram superiores nas concentrações de 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no experimento estático.

Discussão

Existem relatos na literatura onde os autores (RAMSDORF et al., 2009; TENNANT et al., 2001) não encontram indícios de genotoxicidade com o teste do micronúcleo, no entanto o ensaio cometa, um teste reconhecidamente mais sensível, é capaz de detectar quebras ao DNA em células de peixes.

No presente trabalho com a espécie *Rhamdia quelen*, os dados obtidos com o MNP para o experimento estático mostram efeitos genotóxicos da ATZ nas concentrações de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com a dose maior respondendo de forma semelhante à de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Esses dados concordam com os obtidos por (VENTURA et al., 2008), que trabalhando com tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ por um período de 72 horas em sistema estático de exposição, observaram um aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. MORON et al., (2006) encontrou aumento na frequência de micronúcleos em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ por 96 horas. Além de nossos resultados estarem de acordo com esses autores, também demonstram o efeito agudo clastogênico da atrazina sobre eritrócitos de peixes, mesmo na menor dose permitida pela legislação brasileira, 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em águas superficiais (CONAMA, 357/2005). Ainda, os dados do presente trabalho estão de acordo com outros estudos (MATSUMOTO et al., 2006; VENTURA et al., 2008) que mostram que o alterações morfológicas nucleares (incluindo micronúcleos) em eritrócitos de peixes são induzidos por diversos agentes químicos, inclusive em *Rhamdia quelen* como também reportado por (GHISI et al., 2010).

Os dados do experimento semi-estático demonstraram falta de diferença significativa no teste do MNP (Figura 4), entre controle e doses de exposição, possivelmente devido ao menor número de peixes analisados ($N = 10$ para cada grupo), ou mesmo pela menor sensibilidade do teste frente ao ensaio cometa.

Os danos ao DNA observados nesse estudo através do ensaio cometa podem ser originados por quebras de fita simples, dupla fita ou formação de adutos de DNA (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), resultantes da interação do herbicida com o DNA.

No ensaio cometa de eritrócitos, no experimento estático, pudemos observar um aumento dose-dependente nos danos causados ao DNA. Na menor concentração, 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não ocorreu diferença em relação ao controle (Figura 02a), no entanto a mediana do escore desse grupo apresenta-se maior do que a mediana do ao grupo controle (Tabela 01), indicando que a

atrazina mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira pode causar quebras ao DNA de hemácias de *Rhamdia quelen*. VENTURA et. al. (2008), afirmam que a ATZ é genotóxica em concentrações acima de $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, e apesar de não termos obtido resultado de danos significantes no tratamento de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os eritrócitos, as outras duas concentrações utilizadas no presente trabalho corroboram com a afirmação dos autores acima citados.. Adicionalmente, podemos sugerir novos testes com concentrações mais próximas do permitido pela legislação, visto que nossos resultados com o ensaio cometa em eritrócitos apontam para um possível efeito genotóxico desse herbicida nessa concentração ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$), corroborando com o resultado do MNP já citados.

Os resultados obtidos pelo ensaio cometa em brânquias para o experimento estático não demonstrou aumento de dano quando compararmos o controle com os grupos expostos à ATZ (Figura 02b).GHISI et. al. (2010), utilizando o inseticida Fipronil encontraram resposta positiva para genotoxicidade deste xenobiótico com o teste do micronúcleo písceo, no entanto a resposta do ensaio cometa de brânquias foi negativa. Nesse trabalho, as autoras também avaliaram as brânquias através de histopatologia e também não encontraram diferenças significativas entre o as alterações encontradas no controle e as concentrações teste.

Nas brânquias, os escores obtidos para os diferentes grupos foram próximos, no entanto o experimento semi-estático demonstra que a atrazina pode ser genotóxica para esse tecido nas doses de 2 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Alguns autores notaram através do ensaio cometa que as brânquias são mais sensíveis a agentes químicos do que as células sanguíneas (BELPAEME et al., 1998; NWANI et al., 2010). Nossos resultados são concordantes com esses autores apenas na concentração de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ no experimento semi-estático.

NWANI et. al. (2010), testaram os efeitos da atrazina em um experimento crônico, semi-estático, com duração de 35 dias, com amostras de tecidos retiradas de 5 espécimes num intervalo de tempo de 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 35, e realizavam o MNP, ECE e ECB. Eles utilizaram concentrações do contaminante bastante acima das encontradas na natureza, 4,24; 5,30 e $8,48 \text{ mg. L}^{-1}$. Eles encontraram efeito dose-dependente da atrazina sobre *Channa punctatus*, e também que os efeitos genotóxicos atingem um pico em certo período de exposição, seguido por um decréscimo não linear. Com 7 dias de exposição, foi encontrado o maior índice de micronúcleos, e com 5 dias os danos mais altos foram encontrados pelo cometa tanto em brânquias quanto em eritrócitos. De acordo com esses resultados, bioensaios como os apresentados no presente trabalho, de contaminação aguda, conseguem detectar os efeitos genotóxicos da atrazina quando as células ainda não estão com seu mecanismo de

detoxificação agindo sobre esses danos, dando a oportunidade de observarmos danos nas células branquiais mesmo em dose tão pequena como a de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Atrazina pode ser responsável pela indução de estresse oxidativo, interferindo em diferentes parâmetros e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) em algumas espécies de peixes. ROS, como o superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas, são continuamente formados pelo consumo de oxigênio pelos organismos. Exposição a xenobióticos ou poluentes químicos podem produzir problemas no balanço entre ROS endógenos e exógeno, e pode subsequentemente induzir ao decréscimo das defesas antioxidantes ou causar danos oxidativos imediatos ao organismo (VALAVANIDIS et al., 2006). Os peixes, como muitos outros vertebrados, tentam reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo usando um sistema defensivo antioxidante: a primeira linha de defesa consiste nas moléculas antioxidantes, como a glutathione (GSH), vitamina C e E, e os carotenóides (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). Outro mecanismo de defesa é composto por enzimas antioxidantes, incluindo as seguintes enzimas eliminadoras de radicais: superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), etc. (VALAVANIDIS et al., 2006).

JIN et al., (2010), encontraram aumento dose-dependente na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD em fígado de *Danio rerio* após 14 dias de exposição as concentrações de 10, 100 e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ. Em gônadas, apenas na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ os autores observaram aumento da CAT e SOD. A GSH diminuiu significativamente tanto no fígado quanto em gônadas. Essa capacidade da Atrazina em produzir estresse oxidativo está diretamente ligada aos resultados obtidos em nosso trabalho, pois as espécies reativas de oxigênio são capazes de danificar macromoléculas, como o DNA. Os resultados obtidos com eritrócitos no experimento estático e semi-estático e em células de brânquias no experimento semi-estático, apontam para um aumento significativo dos danos ao material genético dessas células principalmente nas maiores concentrações de atrazina, concordando com os dados referentes ao estresse oxidativo obtidos por JIN et. al. (2010) com o zebrafish.

Quanto às diferentes metodologias de exposição testadas, no geral, notamos diferenças entre os tecidos, sendo que as brânquias foram mais sensíveis no experimento semi-estático (Figura 06), enquanto que as células sanguíneas sofreram mais danos no experimento estático (Figura 03). Sabidamente parte do contaminante pode se complexar com a matéria orgânica existente no aquário, volatilizar, sofrer degradação ou ser absorvida pelo recipiente-teste (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). A reposição do contaminante na água no sistema semi-estático

pode estar influenciando nessa diferença de resposta, visto que ao adicionarmos a dose de reposição no aquário, deixamos mais contaminante disponível (não complexado a matéria orgânica) para os animais, e são as brânquias que estão diretamente em contato com esse xenobiótico e que recebem sua ação em bioensaios agudos. Já. Já no experimento estático as brânquias têm um período de contato mais curto com o contaminante na concentração teste, visto que com o tempo a disponibilidade da atrazina diminui na água em que o agente xenobiótico está diluído.

Conclusões

Em geral, nossos resultados mostram que a atrazina causa efeitos genotóxicos sobre o bioindicador *Rhamdia quelen*. Foram encontrados resultados positivos com o teste do micronúcleo písceo e com o ensaio cometa em brânquias na concentração permitida pela legislação brasileira ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$). O efeito dose-dependente desse contaminante, encontrado por outros autores (JIN et al., 2010; NWANI et al., 2010; VENTURA et al., 2008) foi confirmado por nossos dados referentes ao ensaio cometa com eritrócitos no experimento estático. O teste do micronúcleo e o ensaio cometa são ferramentas válidas para a avaliação de genotoxicidade nessa espécie de peixe neotropical, *Rhamdia quelen*, de grande importância econômica para a piscicultura brasileira.

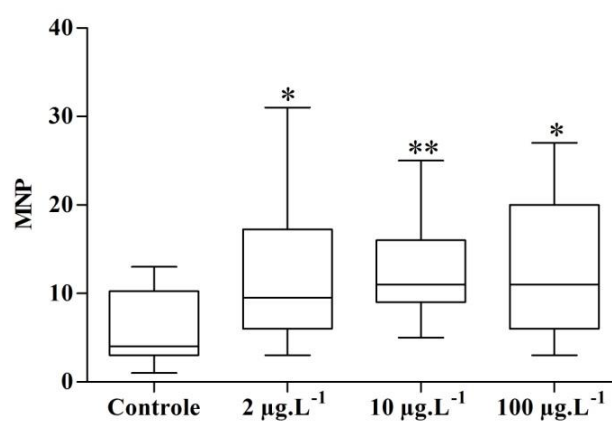


Figura 01 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento estático

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,01$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,001$

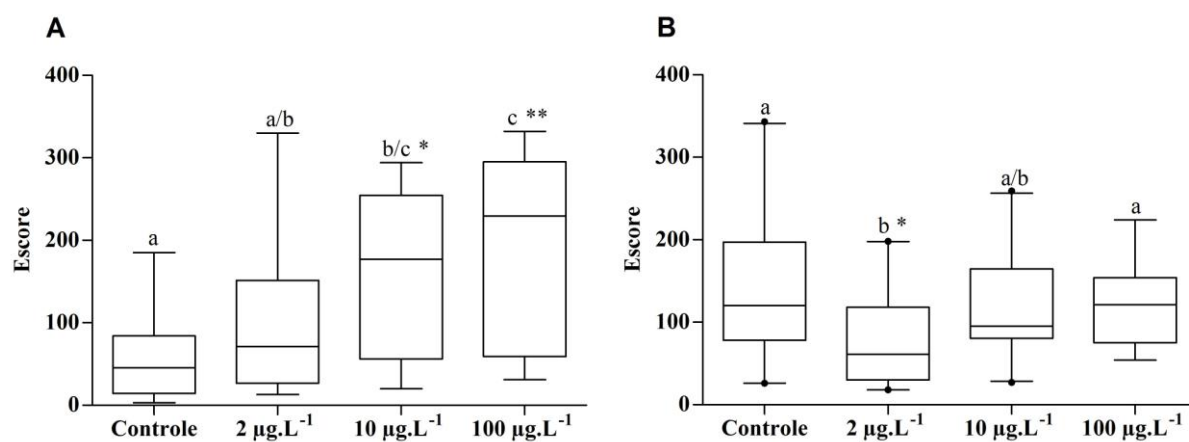


Figura 02 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com atrazina no experimento estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais. Letras minúsculas distintas (a,b,c) representam diferença entre os grupos.

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,01$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,001$.

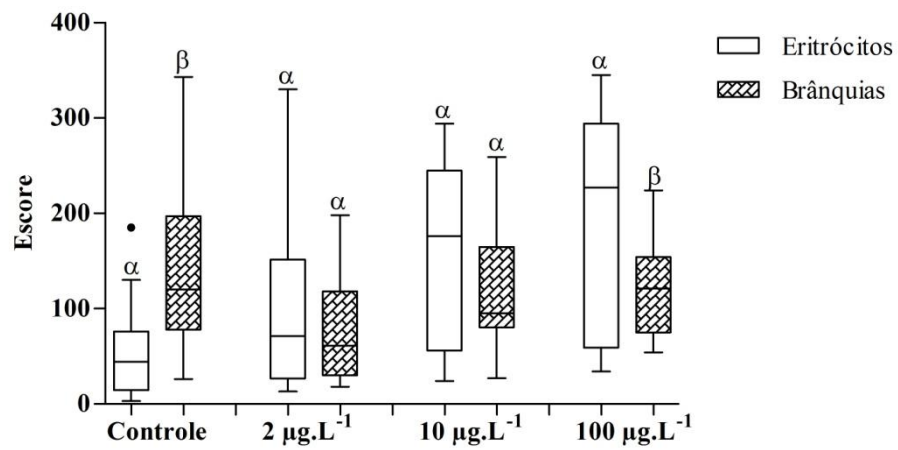


Figura 03 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático. β representa diferença estatística ($P < 0,01$) entre os tecidos dentro de cada grupo teste.

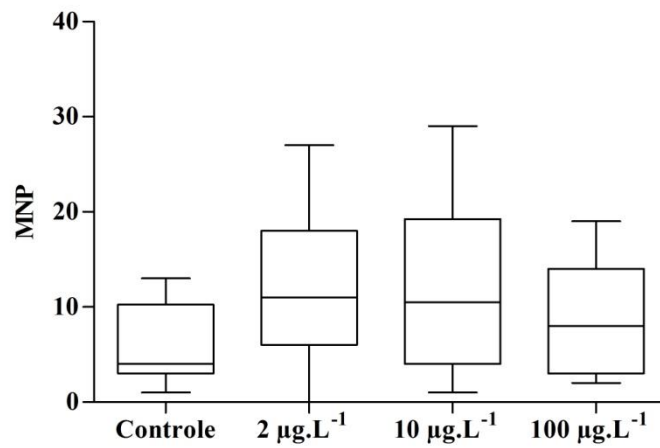


Figura 04 - Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento semi-estático

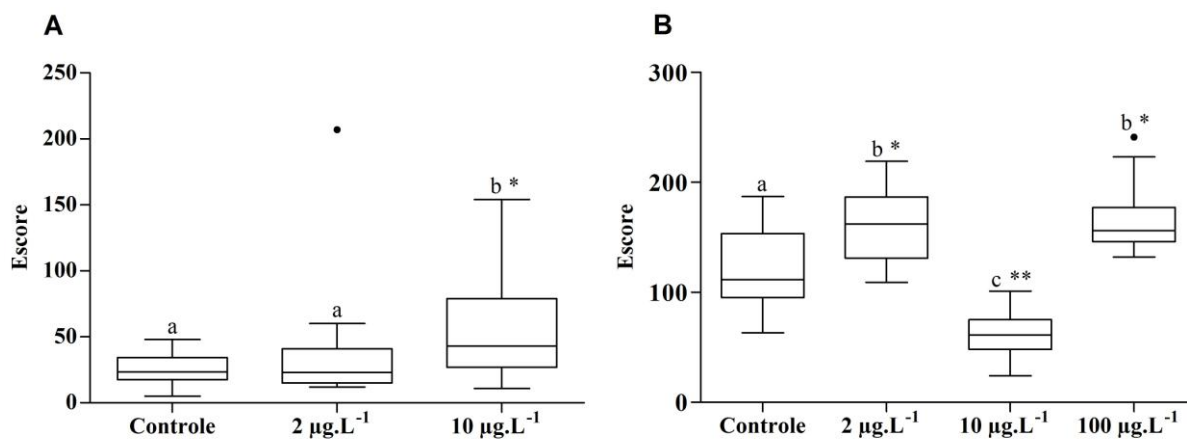


Figura 05 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com atrazina no experimento semi-estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais. Letras minúsculas distintas (a,b,c) representam diferença entre os grupos.

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,05$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,001$.

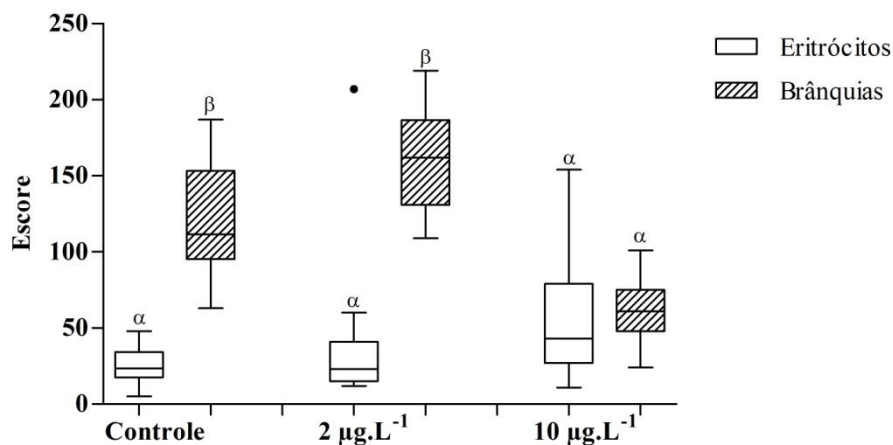


Figura 06 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento semi-estático. β representa diferença estatística ($P < 0,01$) entre os tecidos dentro de cada grupo teste.

TABELA 01 – Comparação entre os escores obtidos nos experimentos estático e semi-estático, através do ensaio cometa em células braquiais e eritrócitos.

	Mediana dos escores nos experimentos			
	Estático		Semi-estático	
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Brânquias				
Controle	120,00	78,00-197,00	111,50	95,25-153,30
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *	61,00	30,25-61,00	162,00	131,00-186,50
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	95,00	80,50-164,80	61,00	48,00-75,00
100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *	121,00	75,00-154,00	156,00	146,00-177,00
Eritrócitos				
Controle	44,00	14,50-76,25	23,50	17,50-34,25
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *	71,00	26,75-151,50	23,00	15,00-41,00
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	176,00	56,25-244,80	43,00	27,00-79,00
100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	229,50	63,50-293,80	-	-

* Significativo entre os experimentos pelo teste de Mann-Whitney, com $P < 0,05$

** Significativo entre os experimentos pelo teste de Mann-Whitney, com $P < 0,01$

CAPÍTULO II

Cloreto de Cobre (II) causa danos ao DNA de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Hepteridae) em concentrações lábeis de em níveis traço, determinadas por IPC-OES.

Resumo

A presença de metais pesados em efluentes industriais e municipais e em rejeitos de mineração tem causado preocupação acerca do potencial mutagênico e carcinogênico dessas substâncias a organismos aquáticos. Sabe-se hoje que a toxicidade de metais não pode ser atribuída, exclusivamente, à concentração total dissolvida. O conhecimento da especiação química de metais é um aspecto determinante na avaliação de seu verdadeiro impacto ambiental. O cobre é um micronutriente para a vida, presente em todos os ambientes aquáticos naturais e sedimentos, no entanto após certos limites naturais o metal passa a ser tóxico ao organismo. O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos genotóxicos do cobre sobre *Rhamdia quelen*, em experimento estático (BE) e semi-estático (BSE), através do teste do micronúcleo pístico (MNP) e do ensaio cometa em eritrócitos (ECE) e brânquias (ECB). Os animais foram expostos as concentrações de 2; 9 e 18 μgL^{-1} de CuCl_2 por 96 horas. O MNP foi realizado de acordo com Hoofman e Raat (1982) e o ensaio cometa de acordo com Speit e Hartmann (1999). Nossos resultados, através do MNP, mostraram genotoxicidade do cobre nas concentrações de 2 e 18 μgL^{-1} no experimento estático, sendo que os vacúolos são o tipo de alteração mais frequente em todos os tratamentos. O ECE detectou quebras ao DNA dose-dependente nos tratamentos 2, 9 e 18 μgL^{-1} no experimento estático, e aumento significativo nos danos em todas as concentrações no BSE. Em brânquias, observamos aumento dos danos em relação ao controle nas concentrações de 9 e 18 μgL^{-1} no BE, e 2, 9 e 18 μgL^{-1} no BSE. A quantificação de cobre lábil nos aquários, detectada por IPC-OES, diminuiu ao longo do tempo, no experimento semi-estático, enquanto que a concentração total de cobre aumentou. Nossos resultados apontam para um efeito genotóxico em concentrações lábeis extremamente baixas do cobre sobre a espécie *Rhamdia quelen*.

Abstract

The presence of heavy metals in municipal and industrial effluents and mine wastes has caused concern about the mutagenic and carcinogenic potential of these substances to aquatic organisms. It is now known that the toxicity of metals cannot be attributed solely to the total dissolved concentration. Knowledge of the chemical speciation of metals is a crucial aspect in assessing its true environmental impact. Copper is a micronutrient for life, present in all natural aquatic environments and sediments, however after some natural limits, the metal becomes toxic. The aim of this study was to evaluate the genotoxic effects of copper on *Rhamdia quelen* in static (BE) and semi-static (BSE) experiments, through the piscine micronucleus test (MNP) and the comet assay in erythrocytes (ECE) and gills cells (ECB). The animals were exposed to concentrations of 2, 9 and 18 μgL^{-1} of CuCl_2 for 96 hours. The MNP was performed according to Hooftman and Raat (1982) and comet assay according Speit and Hartmann (1999). Our results, through MNP, showed genotoxicity of copper at 2 and 18 μgL^{-1} concentrations in the static experiment, and the vacuoles are the most frequent type of change in all treatments. Dose-dependent breaks to the DNA was detected by the ECE in treatments 2, 9 and 18 μgL^{-1} , in the static experiment, and a significant increase in damage at all concentrations in BSE. In gills, we found an increase of damage on 9 and 18 μgL^{-1} concentrations in relation to control group in BE, and 2, 9 and 18 μgL^{-1} on BSE. Quantification of labile copper in aquaria was detected by IPC-OES, and has decreased over time in the semi-static experiment, while the total concentration of copper increased. Our results suggest a genotoxic effect in extremely low labile concentrations of copper under *R. quelen* kind.

Introdução

A contaminação do meio ambiente por metais pesados foi ignorada até 1932, quando ocorreu o trágico evento na baía Minamata - Japão, ocasionado por contínua descarga de mercúrio por efluentes de uma indústria, levando a diversos problemas a comunidade local, e causando centena de mortes (VAZQUEZ, 1999). A presença de metais pesados em efluentes industriais e municipais e em rejeitos de mineração tem causado preocupação acerca do potencial mutagênico e carcinogênico dessas substâncias a organismos aquáticos. Em diversos ecossistemas aquáticos brasileiros, espécies nativas são ameaçadas por essa exposição direta a contaminantes na água ou indireta através da cadeia alimentar (CESTARI et al., 2004).

A partição de metais entre as fases dissolvida e particulada exerce uma influência importante sobre seu transporte, reatividade e biodisponibilidade para a biota aquática. Mais do que isso, sabe-se hoje que a toxicidade de metais não pode ser atribuída, exclusivamente, à concentração total dissolvida. Consequentemente, o conhecimento da especiação química de metais é um aspecto determinante na avaliação de seu verdadeiro impacto ambiental (ALLEN et al., 1996). Uma variedade de ligantes orgânicos e inorgânicos exercem um papel fundamental no controle da partição e da especiação de espécies metálicas em sistemas aquáticos (ALLEN et al., 1996; GRASSI et al., 2000). Uma das principais propriedades destes ligantes é a capacidade de formar complexos estáveis com metais e, em virtude disso, reduzir o potencial tóxico destas espécies (GUO et al., 2001). Na fração dissolvida, os principais compostos responsáveis pela complexação de espécies metálicas são os compostos orgânicos em solução, principalmente as substâncias húmicas aquáticas (SODRÉ et al., 2004).

O cobre é um micronutriente para a vida, presente em todos os ambientes aquáticos naturais e sedimentos. Esse metal é essencial para, virtualmente, todos os organismos vivos. O fluxo natural de concentrações de cobre levou a adaptação de muitos organismos aquáticos influenciando na composição, diversidade e abundância das populações (HALL; ANDERSON, R. D., 1999). No entanto, esse metal pode se tornar tóxico quando sua concentração aumenta acima de certos limites naturais, promovendo danos à maquinaria protéica intracelular. A contaminação de corpos de água doce pode ser devida a mineração, agricultura e atividades manufatureiras, e já forma encontradas concentrações de cobre dissolvido entre 50 µg/L e 560 µg/L (IPCS, 1998; WHO, 1998, US EPA, 2007). Além disso, os sais de cobre também são intencionalmente introduzidos nos corpos d'água como

herbicidas, algicidas e moluscicidas em programas de controle de pragas em todo o mundo (GRAVES et al., 2004).

O conhecimento da toxicidade dos agentes químicos a diferentes organismos aquáticos possibilita, além do estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para a proteção da vida aquática, avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam a biota dos ambientes aquáticos. Dependendo das características físicas e químicas da substância-teste, bioensaios podem ser realizados de maneira estática ou semi-estática. (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006): No modelo estático os organismos são expostos a mesma solução durante o período do experimento. Apesar da facilidade na execução desse tipo de experimento, alguns problemas, como a diminuição da concentração teste, podem ocorrer. No modelo semi-estático, há troca parcial da solução-teste através da remoção de parte da solução e reposição, na mesma concentração desejada.

O teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem sido usado como uma das principais ferramentas na avaliação do potencial clastogênico de diferentes compostos no ambiente aquático. Diversos estudos vêm mostrando que em eritrócitos de peixes a frequência de micronúcleos, bem como outras alterações morfológicas nucleares, aumentam quando os organismos são expostos a diferentes poluentes tanto em bioensaios (GHISI et al., 2010; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; RAMSDORF et al., 2009a; VENTURA et al., 2008) como em trabalhos de campo (DE FLORA et al., 1993; ERGENE et al., 2007; KATSUMITI et al., 2009).

O ensaio cometa é uma técnica já estabelecida a mais de 20 anos, que permite avaliar quebras ao DNA de células em, virtualmente, qualquer tecido. Esse teste é mais comumente aplicado em células sanguíneas porque amostras são mais fáceis de serem obtidas e não é necessário a dissociação celular (BELPAEME et. al., 1996). No entanto, outros tecidos, como as brânquias podem ser utilizados (DEVENTER, 1996), principalmente por esse tecido estar em contato direto com o contaminante.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial genotóxico do cobre sobre *Rhamdia quelen*, através do teste do micronúcleo písceo e do ensaio cometa em eritrócitos e brânquias. Foram realizados experimentos estático e semi-estático, e a concentração do íon cobre foi determinada por análises químicas da água dos aquários

Material e métodos

Preparação da solução teste

Uma solução 1g/L de Cloreto de Cobre (II) (99 %, Acros Organics) foi feita, e a partir desta, foi adicionado a cada aquário a quantidade necessária de solução para se chegar as concentrações de 2, 9 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Desenho experimental

Os espécimes de Jundiá (*Rhamdia quelen*: $14,12 \pm 10,75$ g) foram adquiridos em uma piscicultura na cidade de Toledo-PR, cujo número da licença de operação fornecida pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) é 16624. Os peixes foram aclimatados por 30 dias em tanques de 250 L de água de água filtrada com aeração constante e temperatura média de 26 °C, fotoperíodo de 12 horas e alimentação diária. Uma semana antes do início dos experimentos, oitenta jundiás foram divididos aleatoriamente entre quatro aquários (20 animais por tratamento) de 108 L de água filtrada com condições semelhantes aos tanques de adaptação. Desses aquários, um destinou-se ao grupo controle e três para os grupos teste: 2, 9 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II).

Experimento estático

Nesse modelo experimental não ocorreu troca de água de nenhum dos aquários durante o período de 96 horas de exposição. Os peixes dos grupos teste foram submetidos às doses de 2, 9 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com restrição alimentar durante as últimas 24 horas de exposição. Para se fazer a quantificação do cobre nos aquários, foi retirada uma amostra de água de cada aquário no momento em que a contaminação foi feita e outra depois de decorrida 96 horas de exposição, as amostra foram enviadas ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) pertencente à Universidade Federal do Paraná.

Experimento semi-estático

Da mesma forma que no experimento anterior, neste os peixes também foram expostos ao Cloreto de Cobre (II) por um período de 96 horas, no entanto no modelo semi-estático foi realizada a troca de 1/3 da água dos aquários a cada 24 horas, inclusive no grupo controle. Após a retirada de parte da água do aquário foi feita a reposição do contaminante correspondente a 1/3 da concentração teste de cada grupo e depois se voltou o nível de água

ao volume completo de cada aquário. Foi necessário fazer a troca de água também no grupo controle para que não houvesse interferência do estresse causado pelo processo de reposição de água nos resultados do experimento. Os peixes foram alimentados a cada 24 horas, sofrendo restrição alimentar nas últimas 24 horas que antecederam o término do bioensaio. Para se fazer a quantificação do cobre na água, foram colocados dispositivos DGT nos aquários no momento da contaminação inicial, e foram retirados nos tempos de 24 h, 48 h e 96h, antes das trocas parciais de água e reposição do contaminante.

Teste do Micronúcleo Písceo

Para se verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por HOOFTMAN e RAAT (1982). A amostra de sangue foi coletada do peixe anestesiado (Benzocaína 10%) por pulsão caudal com o auxílio de uma seringa heparinizada. Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e o esfregaço foi feito, uma lâmina para cada animal. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e depois fixadas em etanol absoluto (Merck) por 30 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas em Giensa (Merck) 10% com tampão fosfato pH 6,8. Foram analisadas 2000 células de cada lâmina. Além dos micronúcleos, as alterações morfológicas nucleares (Figura 01) também foram classificadas como indicativos de genotoxicidade de acordo com AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ (2001). As alterações morfológicas nucleares foram classificadas (Figura 01) segundo CARRASCO; TILBURY; MYERS (1990).

Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com SPEIT e HARTMANN (1999). Para o ensaio cometa com eritrócitos (ECE), uma gota de sangue foi misturada a 1 mL de soro fetal bovino. Para realizar o ensaio cometa com células branquiais (ECB), foi retirado o primeiro arco branquial do lado direito de cada peixe foi coletado, em seguida o arco branquial foi lavado com PBS para retirar o máximo possível de sangue da amostra. Os filamentos branquiais foram separados do arco e então colocados em um microtubo contendo 0,5 mL de soro fetal bovino e depois o tecido foi homogeneizado à ~15.000 rpm (Tecnal – TE-103). Segundo (RAMSDORF et al., 2009b), o soro fetal bovino é a melhor solução para manter a viabilidade celular por até 48 horas.

A confecção das lâminas tanto para o ECE quanto para o ECB seguiram os mesmo passos após a coleta do sangue e a homogeneização do tecido branquial. Foram misturados 10 µL de suspensão celular com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Essa mistura foi então disposta sobre uma lâmina de microscopia, previamente coberta com uma fina camada de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL de PBS). As lâminas foram colocadas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl, 2.5M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0.8%; N-lauryl-sarcosinate, 1%; solução de lise uso: 1 ml Triton X100; 10 ml DMSO; e 89 ml de solução de lise estoque) por 24 horas a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, onde ficaram por 20 minutos imersas no tampão de eletroforese (300 mM NaOH/1 mM EDTA) com pH > 13 para que ocorresse o desenrolamento parcial do DNA. A eletroforese foi realizada a 300 mA, 25 V por 25 minutos, em seguida as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M de Tris, pH 7,5; fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e coradas com 20 µL de brometo de etídeo (10 µg.mL⁻¹). Cem nucleóides de cada lâmina foram classificados usando-se um microscópio de epifluorescência Zeiss.

Análise química

No bioensaio estático, as amostras de água foram enviadas ao CEPPA para a quantificação do cobre. A metodologia empregada por esse laboratório pode ser consultada na referência: *STANDARD methods for examination of water and wastewater* (2005).

Em relação ao experimento semi-estático, a técnica utilizada para a especiação química foi a difusão em filmes finos por gradiente de concentração, também conhecida como DGT. Consiste em um método não eletroquímico que utiliza material sólido para quantificar as espécies lábeis. Este método foi proposto por ZHANG; DAVISON (2000) para especiação in situ em ambientes aquáticos (PESAVENTO et al., 2009). Esta técnica baseia-se em processos dinâmicos de difusão, e destaca-se pela inexistência de interferentes relacionados à coleta, armazenamento e tratamento da amostra, uma vez que somente a eluição e a determinação ocorrem em laboratório (ALEXA et al., 2009; TORRE et al., 2000).

Fisicamente, o dispositivo consiste em tampa e base de acrílico, uma membrana de nitrato de celulose com porosidade de 0,45 µm para proteger a camada difusiva, camada de 0,4 - 2 mm de poliacrilamida ou agarose e camada de resina de troca iônica, hidrogel impregnado com resina quelante (SANGI et al. 2002; TWISS; MOFFET 2002; KERSANACH et al., 2009). Os metais difundem-se através da camada de gel de difusão, gerando gradientes de concentração e são acumulados na camada de material sólido

adsorvente, argilomineral Montmorilonita, onde são acumulados e pré-concentrados. Após um tempo (t) de exposição, os metais são eluídos da resina com solução ácida e determinados espectroscopicamente (SANGI et al., 2002; TWISS e MOFFET, 2002). A massa de metal acumulado determinada está diretamente relacionada com a concentração do metal em solução (SCALLY et al., 2006).

Para a obtenção do coeficiente de difusão do metal nas condições do trabalho (T=23 °C e pH 6,0) um dispositivo foi aplicado em uma solução de concentração conhecida e similar a utilizada no bioensaio, 18 µg L⁻¹, por 24 horas. Após a retirada dos dispositivos DGT dos aquários, eles foram levados ao Laboratório de Química Ambiental (LabQAM - UFPR) onde o material foi eluído com 3 mL de ácido nítrico 1 mol/L por 24 h e determinou-se a concentração do metal por ICP-OES (espectrometria de emissão atômica com plasma opticamente induzido) (Thermo Scientific, iCAP 6500).

Análise estatística

Para a comparação entre os diferentes grupos, tanto para o MNP quanto para ECE e ECB, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, sendo que para se comparar a média dos postos utilizou-se *Student-Newman-Keuls*. Para se comparar os resultados obtidos para sangue e células branquiais dentro de cada grupo (concentração do cloreto de cobre), foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. Quando comparamos se existia diferença entre os diferentes tipos de alterações encontradas dentro de cada grupo teste, utilizamos o teste de *Friedman*. As análises estatísticas foram feitas pelo software Bioestat 5.0 (AYRES, 2007).

Resultados

Bioensaio estático

Ocorreu a morte de dois indivíduos pertencentes ao tratamento $9 \mu\text{g.L}^{-1}$, nos demais grupos não ocorreu perda de animais durante o período de exposição de 96 horas. O Teste do micronúcleo pisco (MNP), mostrou diferença entre o controle e as concentrações de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0341$) e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0024$), não observando-se diferença entre essas duas concentrações ($p = 0,3509$). Os animais expostos a $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram a frequência alterações morfológicas nucleares semelhantes ao controle ($p = 0,1222$) (Figura 02). Também foram comparadas as frequências de micronúcleos e das diferentes alterações nucleares, entre os grupos controle e expostos ao cobre, sendo que não foi observada diferença entre eles, quando comparados os grupos entre si para cada alteração (Tabela 01).

No grupo controle, os vacúolos foram mais frequentes do que os micronúcleos, bi-núcleos, *lobed* e *blebbed* ($p < 0,0001$) e também mais presentes que o *notched* ($p < 0,001$). No tratamento de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ os vacúolos apareceram em maior número em relação à *blebbed*, bi-núcleos, micronúcleos ($p < 0,0001$) e *lobed* ($p < 0,001$). Nesse grupo também ocorreu diferença entre *notched* e bi-núcleos ($p < 0,001$), sendo que o primeiro tipo de alteração foi mais frequente. No grupo $9 \mu\text{g.L}^{-1}$, bi-núcleos, *lobed* ($p < 0,001$), micronúcleos ($p < 0,001$) e *blebbed* ($p < 0,05$) apareceram em menor número em relação aos vacúolos. O tratamento $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CuCl_2 , bi-núcleos apareceram em menor frequência do que *blebbed*, *notched* ($p < 0,05$) e vacúolos ($p < 0,0001$). Esse último tipo de alteração também foi mais frequente que micronúcleos, *lobed* ($p < 0,0001$), *blebed* e *notched* ($p < 0,05$) neste grupo (Tabela 01).

Os resultados obtidos através do ECB não apontaram para uma diferença significativa entre os grupos controle e $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,4841$), no entanto ocorreu diferença significativa entre o controle e os grupos expostos as concentrações de 9 e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0460$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Também se observou diferença entre os grupos de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0113$) e entre $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$) (Figura 03b).

No ensaio cometa de eritrócitos (ECE), foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0057$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).. Os peixes exposto a $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cloreto de Cobre (II) também apresentaram danos significantemente superiores em comparação aos expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0008$) (Figura 03a).

Utilizando o teste de *Wilcoxon* para compararmos os escores obtidos para os dois tecidos utilizados, pudemos notar que apenas no grupo controle os danos causados pelo cloreto de cobre foram maiores às células branquiais em relação aos eritrócitos ($p = 0,0011$). Nos tratamentos 2, 9 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II), os escores obtidos para as células sanguíneas foram sempre significativamente maiores em relação as brânquias ($p = 0,0073$, $p = 0,0142$ e $p = 0,0009$, respectivamente) (Figura 04).

Quanto às análises químicas da água no experimento estático, todas as amostras coletadas apresentaram concentração de cobre menor que 0,05 mg.L^{-1} . Como as concentrações de cloreto de cobre (II) adicionadas aos aquários foram menores do que 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os resultados apresentados pelo CEPPA não puderam ser aproveitados.

Bioensaio semi-estático

Nesse experimento, não ocorreu mortalidade em qualquer tratamento durante as 96 horas de exposição. Com o teste do micronúcleo písceo, não observamos diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos expostos ao cloreto de cobre (II) ($p = 0,8555$, Figura 05). Também não observamos diferença entre grupo controle e contaminados quando considerado cada tipo de alteração morfológica nuclear em separado. No entanto, quando comparamos a frequência dos diferentes tipos de alteração dentro de cada grupo, pudemos notar que no controle negativo, os vacúolos eram mais frequentes do que micronúcleos ($p < 0,0001$), bí-núcleos ($p < 0,001$), *lobed* e *blebbed* ($p < 0,05$). No grupo tratado com 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II), os micronúcleos foram encontrados em menor número do que *notched* ($p < 0,05$) e vacúolos ($p < 0,0001$). Este último tipo de alteração também foi mais frequente do que bi-núcleos ($p < 0,0001$), *blebbed* e *lobed* ($p < 0,001$). *Notched* foi encontrado com mais abundância do que os bi-núcleos ($p < 0,001$). No grupo 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os vacúolos foram observados com maior frequência do que bi-núcleos ($p < 0,001$) e micronúcleos ($p < 0,0001$), e no grupo 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mais presentes do que *blebbed*, micronúcleo, *lobed* e bi-núcleo ($p < 0,0001$). Nesse último tratamento, o bí-núcleo também foi menos recorrente do que *notched* ($p < 0,05$) (Tabela 02).

Para o ECE, ocorreu diferença significativa entre o controle e os grupos expostos a 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II) ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0028$, respectivamente), no entanto o grupo exposto a 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, apresentou o maior escore quando comparado ao tratamento 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 06a).

O ECB também mostrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$), $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0021$) e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$) de cloreto de cobre (II), além disso, a mediana dos escores desses grupos foram bastante similares (Figura 06b).

No bioensaios semi-estático, quando comparados os escores obtidos pelo ensaio cometa para os diferentes tecidos, as células branquiais com maior quantidade de danos ao DNA do que os eritrócitos. Comparando estes escores, para o grupo controle $p = 0,0005$, para o grupo exposto a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ $p = 0,0019$, para $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ $p = 0,0309$ e para $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ $p = 0,0038$ (Figura 07).

Na Tabela 02, podemos comparar as diferentes metodologias de contaminação por via hídrica empregadas na exposição ao cloreto de cobre (II), utilizando o ECE e o ECB e analisando estatisticamente os dados segundo o teste de Mann-Whitney. No ECB, pudemos notar que ocorreu diferença entre os escores encontrados para os três grupos expostos. Comparando os experimentos estáticos e semi-estáticos, o grupo de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II) apresentou mais danos ao DNA de brânquias no experimento semi-estático ($p < 0,0001$), o mesmo acontecendo com o grupo de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0493$) e com o grupo de $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$). Para o ECE, pudemos notar que ocorreu diferença apenas em 2 grupos expostos. Comparando os experimentos estáticos e semi-estáticos os grupos de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II) não apresentaram diferença significativa ($p = 0,2468$), o mesmo acontecendo com os grupos controles ($p = 0,1608$), mas observou-se diferença entre os grupos de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,0003$) e entre os grupos de $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,0001$), demonstrando que o grupo estático apresentou mais danos ao DNA de eritrócitos. Apesar dos grupos controles e de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de cobre (II) não terem apresentado diferença significativa no experimento estático, eles apresentaram mais danos do que os do semi-estáticos.

Quanto às análises químicas da água no experimento semi-estático, optamos por utilizar uma metodologia diferente do experimento anterior (estático). Os resultados obtidos na quantificação do íon cobre foram bem mais satisfatórios com a metodologia de difusão em filmes finos por gradiente de concentração. Como a calibração do aparelho foi feita para detectar concentrações acima de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, foi possível mensurar a concentração de cobre apenas nos tratamentos expostos a 9 e $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CuCl_2 . No tratamento de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi detectado nos tempos de 24, 48 e 96 horas as concentrações de 1,6; 2,8 e $3,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, enquanto que a concentração lábil do metal ficou em 0,18; 0,16 e $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. No aquário exposto a $18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, foi detectado 5; 5,1 e $5,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, e a

concentração biodisponível para os peixes em 0,57; 0,29 e 0,15 μgL^{-1} , para os tempos de 24, 48 e 96 horas, respectivamente (Tabela 03).

Discussão

A poluição por metais é um grande problema devido a alta estabilidade e persistência desses químicos no meio ambiente. Poluentes advindos de fontes naturais e antropogênicas têm o ambiente aquático como destino final. Dessa forma, a acumulação e persistência de metais no ambiente aquático constitui uma ameaça a vida biológica (CAVAS et al., 2005).

Entre outras desordens causadas pelo cobre, anormalidades na função reprodutiva masculina têm sido descritas. WU et. al. (1996) reportam que a contagem de espermatozoides, viabilidade e volume do sêmen diminuem em trabalhadores expostos a solda elétrica BATAINEHT et. al. (1998) relatam que um longo período de ingestão de cloreto de cobre afeta adversamente o comportamento sexual, fertilidade e peso dos testículos e órgãos sexuais acessórios de ratos adultos. Exposições crônicas de ratos a vapor de cloreto de cobre causaram diminuição da concentração de FSH, LH e testosterona no plasma, além de disfunções nas gônadas e na espermatogênese (GABUCHYAN, 1987). Mais recentemente, CHATTOPADHYAY et. al. (2005) descreveram que ratos jovens expostos a concentrações entre 1000 µg/kg/dia e 3000 µg/kg/dia de cloreto de cobre, sofrem alterações na atividade da enzima testicular 17β-HSD (Hidroxiesteróide desidrogenase), nível sérico de testosterona e LH.

O sulfato de cobre é o sal mais comumente utilizado em estudos que visam avaliar os possíveis efeitos tóxicos do cobre, no entanto o cloreto de Cobre (II) apresenta uma LC50 menor para *Tigriopus japonicus* do que o sulfato (KWOK et. al., 2008). YILDIZ et. al. (2009), expuseram bulbos de *Allium cepa* a 15 e 30 µg.L⁻¹ de sulfato de cobre e verificaram diminuição no índice mitótico nas células exposta, aumento na frequência de aberrações cromossômicas e também aumento em quebras ao DNA evidenciadas pelo ensaio cometa. Especificamente com o cloreto de cobre (II), efeitos genotóxicos para plantas foram descritos por INCEER et. al (2000) em *Vicia hirsuta* (unha-de-gato) e INCEER et. al. (2003) em *Helianthus annuus* L.(girassol).

Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal depois da anáfase (AL-SABTI, 1995). Nossos resultados obtidos através do teste do micronúcleo písceo que, como explicado na metodologia, engloba as alterações nucleares, mostraram diferença entre o grupo controle e as concentrações de 2 e 18 µg.L⁻¹, mas diferença significativa em relação a concentração intermediária não ocorreu, no entanto esta concentração de CuCl₂

provocou alterações nucleares nos eritrócitos em maior quantidade do que no controle (Figura 2). Já no experimento semi-estático, não ocorreu diferença estatística entre qualquer grupo. YADAV; TRIVEDI, (2009), submeteram peixes da espécie *Channa punctata* a $407 \mu\text{gL}^{-1}$ de cobre e observaram diminuição do índice mitótico em células renais, além de aumento significativo no número de aberrações cromossômicas após 24, 48, 72, 96 e 168 horas de exposição, no entanto eles relatam uma diminuição na frequência de quebras após 72 horas de exposição. Este resultado leva a uma diminuição de células micronucleadas, pois quebras cromossômicas é um fator importante na contribuição para a formação de micronúcleos.

Estudos a respeito da formação dos diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares são escassos. Dentre as alterações morfológicas nucleares, os vacúolos são associados a processo de necrose (RIBEIRO, et. al., 2003). Nossos resultados para o teste do micronúcleo písceo mostrou diferença entre tratamentos e controle apenas quando somados todos os tipos de alterações nucleares. Em nossos resultados, os vacúolos foram os tipos de alteração nuclear mais frequentes (Tabela 02), e portanto a necrose pode ser um processo bastante recorrente nas células dos animais utilizados nesse estudo, inclusive nos peixes do grupo controle visto que não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos. Trabalhos como o de ÇAVAS, et. al., (2005), que analisam apenas alguns tipos de alterações morfológicas, no caso apenas o binúcleo, além do micronúcleo, podem estar subestimando os efeitos causados pelo contaminante ao organismo bioindicador. Esses autores encontraram aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos, brânquias e fígado de *Cyprinus carpio* expostos a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre, e aumento na frequência de micronúcleos apenas em brânquias de carpas contaminadas com $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$. Já em relação a frequência de células binucleadas, os autores encontraram aumento em células branquiais das carpas expostas a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$. Eles obtiveram resultados similares para *Carassius gibelio*. Já ARKHIPCHUK; GARANKO, (2005), também utilizando micronúcleos e binúcleos, observaram aumento na frequência somente de binúcleos em *Carassius auratus gibelio* expostos a 0,1 e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre, enquanto que em células das nadadeiras foi observado aumento somente na frequência de micronúcleos na menor dose, e em ambos tipos de alteração na concentração maior. Em brânquias, os autores observaram aumento na frequência de micronúcleos e binúcleos para a concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre.

CHAIRI et al., (2010), trabalhando com três espécies de linguado, encontraram um efeito espécie específico do cobre em relação ao acúmulo deste metal no fígado e lesões ao DNA. As duas espécies que acumularam mais cobre no fígado apresentaram danos ao DNA

de hepatócitos com apenas 3 horas de exposição, enquanto que a espécie que acumulou menos cobre teve quebras no DNA apenas depois de 24 horas. GABBIANELLI et al., (2003), através do ensaio cometa, encontraram efeitos genotóxicos à eritrócitos de *Sparus aurata*, após 20 dias de exposição a 1 mg.L^{-1} de CuSO_4 .

Nossos dados apontam para um aumento nos danos causados ao DNA de eritrócitos conforme aumentou a concentração do CuCl_2 no experimento estático, enquanto que no semi-estático ocorreu quebras ao material genético das hemácias, no entanto esse dano não foi dose-dependente. Em células branquiais, no experimento semi-estático, foi observado aumento significativo dos danos em todos os tratamentos com CuCl_2 , enquanto que no experimento estático este aumento ocorreu para as duas maiores concentrações. ARELLANO et al., (1999), descrevem diversas alterações histopatológicas causadas pelo CuSO_4 na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, tanto em brânquias como no fígado, evidenciando o potencial tóxico deste metal.

BOPP et al., (2008), estudando os efeitos do cobre, nas concentrações de 2,03; 63,54 e $158,85 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, sobre células braquiais de truta arco-íris, em cultivo, encontraram quebras no DNA de células dos tratamentos, além de encontrar aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da viabilidade celular. Os autores sugerem que o estresse oxidativo, através da formação de ROS, funciona como um gatilho para a apoptose e a genotoxicidade. Os autores também relatam que todos os parâmetros estudados mudam de acordo com o pH. Em pH 6,0, eles encontraram mais quebras ao DNA, menor viabilidade celular e aumento da formação de ROS quando comparados ao pH 7,0. Essa diferença se deve ao fato de que em pH mais baixo, a concentração de íons Cu^{2+} aumenta. Apesar de os autores creditarem ao estresse oxidativo o maior potencial para causar genotoxicidade, eles assumem que o cobre pode também causar danos diretos ao DNA, como sugerido por PRÜTZ et. al., (1990).

Apesar da utilização do sistema semi-estático para se manter a concentração do contaminante estável durante a realização do experimento, pudemos notar que apesar da manutenção (e até mesmo aumento) da concentração total de cobre, observa-se que com o passar do tempo, ocorre queda na concentração de cobre lábil (Tabela 03), uma vez que há aumento da presença de material orgânico no aquário, ocasionando uma diminuição da disponibilidade do metal devido à interação do mesmo com a fração orgânica, seja sendo adsorvido, complexado, etc. Uma variedade de ligantes orgânicos e inorgânicos tem capacidade de formar complexos estáveis com metais e, em virtude disso, reduzir o potencial tóxico de espécies metálicas (GUO et al., 2001). Na fração dissolvida em sistemas aquáticos,

os principais compostos responsáveis pela complexação de espécies metálicas são os compostos orgânicos em solução, principalmente as substâncias húmicas aquáticas (SODRÉ, 2004).

Sendo assim, nossos resultados sugerem que o cobre causa danos ao DNA de hemácias em concentrações extremamente baixas, visto que ao final do experimento semi-estático, no tratamento $9 \mu\text{g L}^{-1} \text{CuCl}_2$, restavam apenas $0,0899 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre biodisponível para os peixes. Essa concentração é quase 100 vezes menor do que o permitido pela legislação brasileira para cobre livre em águas de classe I, destinadas a preservação de espécies aquáticas. Em brânquias, também ocorreram danos severos ao DNA, e segundo ARELLANO et al., (1999), as brânquias são órgãos capazes de bioacumular cobre, apesar de ser por um período de tempo menor que o fígado.

Conclusão

Nossos resultados mostram efeitos genotóxicos do cobre através do teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa de eritrócitos e brânquias em concentrações de cobre bem abaixo das usualmente utilizadas em outros bioensaios, e abaixo do limite permitido hoje pela legislação brasileira (CONAMA, 357/2005). A análise química da água revela que mesmo em sistema semi-estático ocorre decaimento da porção lábil de cobre, ou seja, a fração biodisponível do metal cai ao passar do tempo, e mesmo nessas concentrações baixíssimas o cobre é capaz de causar efeitos genotóxicos à *Rhamdia quelen*.

Os biomarcadores utilizados no experimento são capazes de detectar danos causados pelo metal. Eles podem ser considerados, quando utilizados em conjunto, uma eficiente ferramenta para a detecção de efeitos genotóxicos causados por agentes xenobióticos aos peixes.

TABELA 01 – Frequência das diferentes alterações morfológicas encontradas nos experimentos estático e semi-estático. A tabela compara os diferentes tipos de alterações encontradas dentro de cada tratamento.

	Estático				Semi-estático			
	Controle	2 µg.L ⁻¹	9 µg.L ⁻¹	18 µg.L ⁻¹	Controle	2 µg.L ⁻¹	9 µg.L ⁻¹	18 µg.L ⁻¹
Micronúcleo	0,005 a	0,017 a	0,036 a	0,029 a	0,005 a	0,010 ab	0,000 a	0,010 a
Vacúolo	0,248	0,389	0,336	0,440	0,534	0,538	0,496	0,502
Notched	0,023 a	0,123	0,077	0,067 a	0,242	0,136	0,149	0,106
Blebbled	0,015 a	0,044 a	0,049 a	0,064 a	0,089 a	0,050 a	0,056	0,013 a
Lobed	0,015 a	0,049 a	0,003 a	0,044 a	0,074 a	0,036 a	0,049	0,016 a
Bi-núcleo	0,005 a	0,000 ab	0,011 a	0,002 abc	0,015 a	0,003 ab	0,012 a	0,000 ab

a Significativo entre Vacúolo e outros tipos de alteração morfológica nuclear pelo teste de Friedman, com $P < 0,05$.

b Significativo entre *Notched* e outros tipos de alteração morfológica nuclear pelo teste de Friedman, com $P < 0,05$.

c Significativo entre *Blebbled* e outros tipos de alteração morfológica nuclear pelo teste de Friedman, com $P < 0,05$.

TABELA 02 – Comparação entre os modelos experimentais. Mediana, primeiro e terceiro quartís (Q1-Q3) dos escores obtidos em células braquiais e eritrócitos dos experimentos estático e semi-estático.

	Mediana dos escores nos experimentos			
	Estático		Semi-estático	
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Brânquias				
Controle	101	56,25-142,50	111,50	95,25-153,30
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	77	45-109	284	242-318
9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *	169	92-226	213	142,50-280
18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	192	151-233	294	243-322
Eritrócitos				
Controle	27	19,50-51,50	23,50	17,50-34,25
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	186	46-268,50	179	141-263,50
9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	261,50	219-283,50	122,50	90,50-186,30
18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	298	262-323	104	100-120

* Significativo entre os experimentos pelo teste de Mann-Whitney, com $P < 0,05$

** Significativo entre os experimentos pelo teste de Mann-Whitney, com $P < 0,001$

TABELA 03 – Quantificação total e lábil do cobre no experimento semi-estático. Concentração dada em $\mu\text{g.L}^{-1}$, determinada por ICP-OES.

Concentrações de Cobre detectadas			
Tratamento	Tempo	Total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Lábil ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	24 h	1.6	0.1809
9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	48 h	2.8	0.1593
9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	96 h	3.25	0.0899
18 $\mu\text{g.L}^{-1}$	24 h	5	0.5695
18 $\mu\text{g.L}^{-1}$	48 h	5.1	0.2896
18 $\mu\text{g.L}^{-1}$	96 h	5.5	0.1523

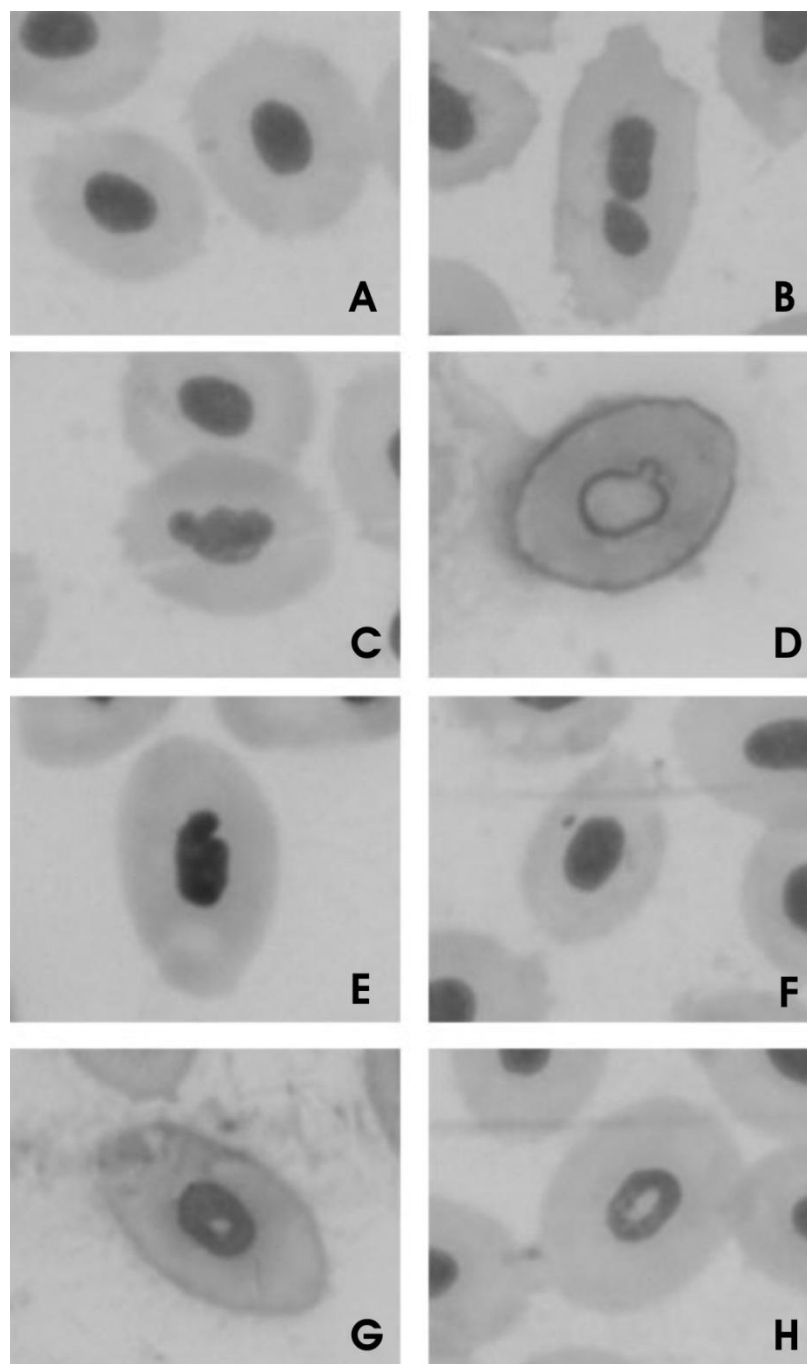


Figura 01 – Micronúcleo e alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao CuCl₂. (A) Células normais; (B) binúcleo; (C) *Lobed*; (D) *Blebbed*; (E) *Notched*; (F) Micronúcleo e (G-H) Vacuolos.

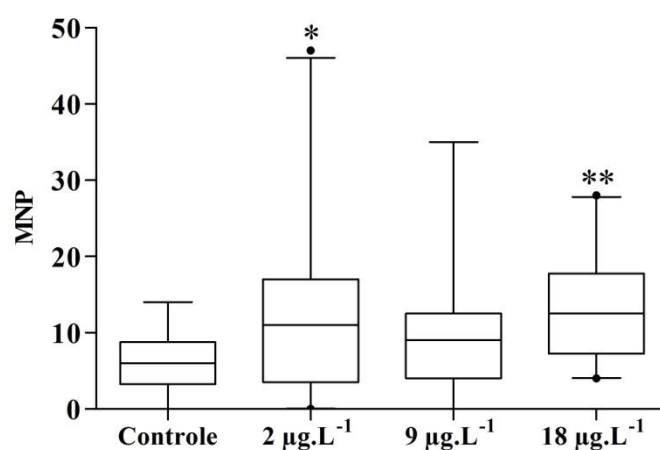


Figura 02 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento estático

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,05$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,01$

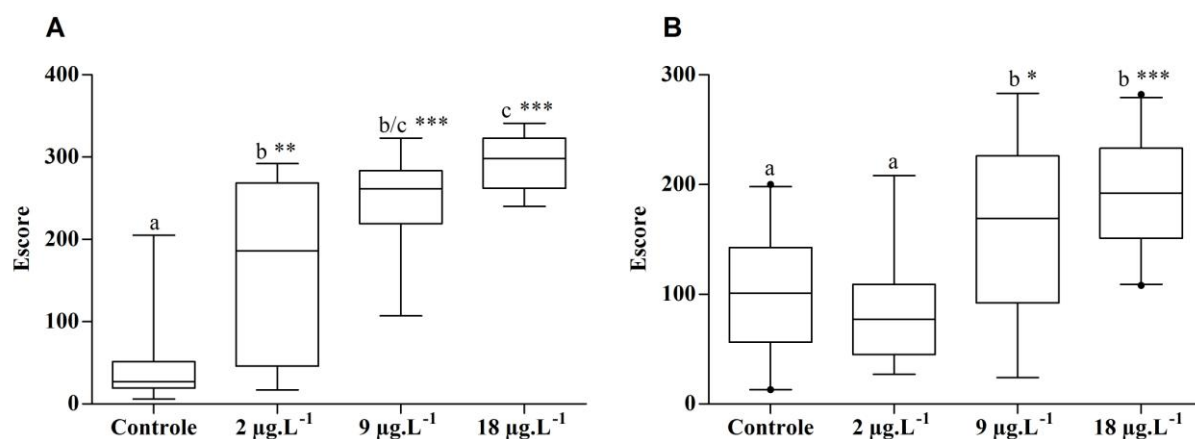


Figura 03 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com CuCl_2 no experimento estático. A: Eritrócitos. B: Células branquiais. Letras minúsculas distintas (a,b,c) representam diferença entre os grupos.

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,05$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,01$

*** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,0001$.

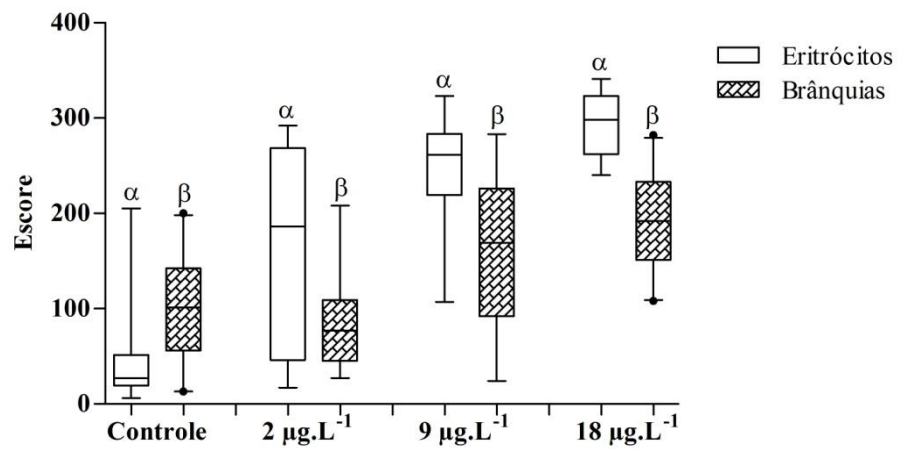


Figura 04 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático. β representa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tecidos dentro de cada grupo teste.

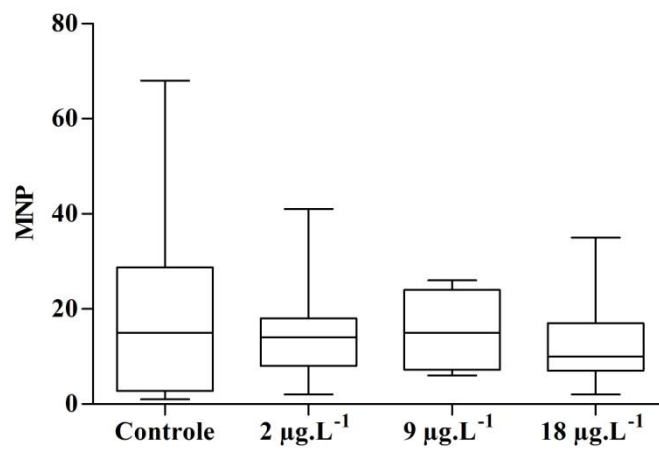


Figura 05 – Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares encontradas no experimento semi-estático

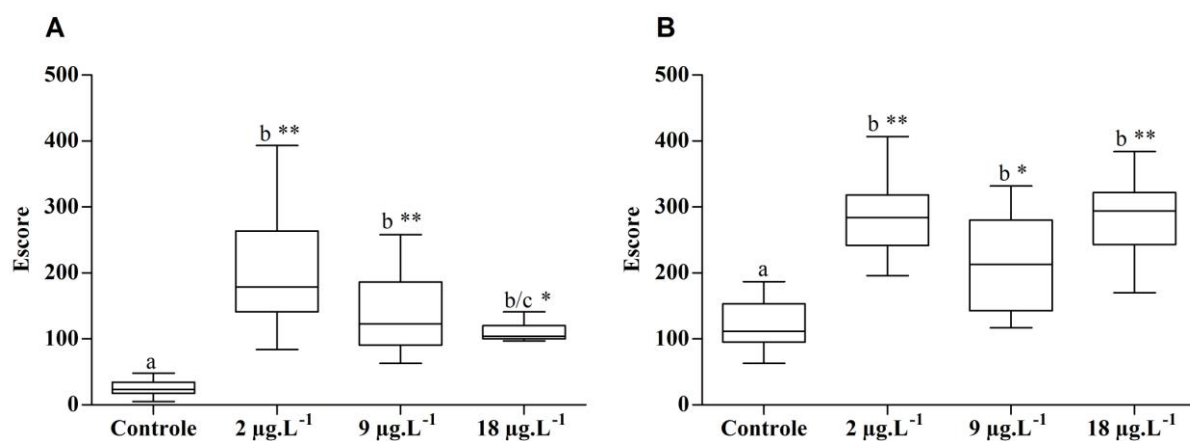


Figura 06 – Comparação entre os escores do grupo controle e os três tratamentos com CuCl_2 no experimento semi-estático. A: Eritrócitos. B: Células brânquiais. Letras minúsculas distintas (a,b,c) representam diferença entre os grupos.

* Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,01$.

** Significativo em relação ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, com $P < 0,0001$

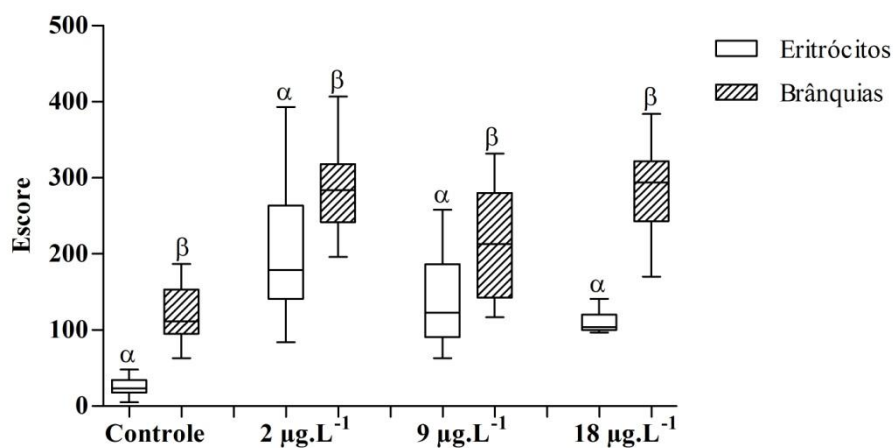


Figura 07 – Comparação entre os escores de eritrócitos e brânquias obtidos no experimento estático. β representa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tecidos dentro de cada grupo teste.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, 1995.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation research**, v. 463, n. 2, p. 111-72, 2000.

ALEXA, N.; ZHANG, H.; LEAD, J. R. development of a miniaturized diffusive gradients in thin films (DGT) device. **Analytica Chimica Acta**, v. 655. p. 80, 2009.

ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, v. 68, p. 42-54, 1996.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. cap. 6, p. 117-152. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa Editora, São Carlos, 2006.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales sole*, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 44, n. 1, p. 62-72, 1999.

ARKHIPCHUK, V V; GARANKO, N N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 62, n. 1, p. 42-52, 2005.

ARMAS, E. D. DE; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, n. 3, p. 221-5, 2001.

AZEVEDO, D. D. A; GERCHON, E.; REIS, E. O. D. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 292-299, 2004.

BATAINEH, H.; AL-HAMOOD, M. H.; ELBETIEHA, A. M. Assessment of aggression, sexual behaviour and fertility in adult male rat following long term ingestion of four industrial metal salts. **Human Experimental Toxicology**, v. 17(10), p. 570-576, 1998.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation research**, v. 415, n. 3, p. 167-84, 1998.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout *Salmo trutta fario* using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 11, p. 485–492, 1996.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 807-821, 1985.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BOPP, S. K.; ABICHT, H. K.; KNAUER, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 86, n. 2, p. 197-204, 2008.

BYER, J. D.; STRUGER, J.; SVERKO, E.; KLAUWUNN, P.; TODD, A. Spatial and seasonal variations in atrazine and metolachlor surface water concentrations in Ontario (Canada) using ELISA. **Chemosphere**, v. 82 (8), p. 1155-1160, 2011.

CAMPBELL, P. C. G. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. In: SHEFFER, E. W.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. **Química Nova**, v. 30, n.º. 2, p. 332-338, 2007.

CAMPOS, A. E. L.; NUNES, G. S.; OLIVEIRA, J. C. S. DE; TOSCANO, I. A. S. Avaliação da contaminação do Igarapé do Sabino (Bacia do Rio Tibiri) por metais pesados, originados dos resíduos e efluentes do Aterro da Ribeira, em São Luís, Maranhão. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 960-964, 2009.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; GARANKO, NATASHA N; ARKHIPCHUK, VICTOR V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 43, n. 4, p. 569-74, 2005.

CERICATO, L.; NETO, J. G. M.; KREUTZ, L. C.; et al. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 149, n. 3, p. 363-7, 2009. Elsevier Inc.

CESTARI, MARTA MARGARETE; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. D. O.; et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.

CHAIRI, H.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; NAVAS, J. I.; et al. In vivo genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO₄. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 6, p. 1279-85, 2010.

CHATTOPADHYAY, A.; SARKAR, M.; BISWAS, N. M. Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 3, n. 12, p. 392-400, 2005.

COVA, D.; ROSSINI, L.; NATALI, P. et al. Assessment of the toxicological risk of pesticides and its correlation to the 20 physicochemical characteristics and tissue distribution. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 27, p. 531-537, 1989.

COX, C. ATRAZINE : TOXICOLOGY. **JOURNAL OF PESTICIDE REFORM**, v. 21, n. 2, p. 12-20, 2001.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DE FLORA, S.; VIGANÒ, L.; D'AGOSTINI, F.; et al. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation research**, v. 319, n. 3, p. 167-77, 1993.

DE LAENDER, F.; C. DE SCHAMPHELAERE, K.; M. VERDONCK, F.; et al. Simulation of Spatial and Temporal Variability of Chronic Copper Toxicity to *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* in Swedish and British Surface Waters. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 11, n. 6, p. 1177-1191, 2005.

DE PINNA, M. C. C. Teleostean monophyly, p 147–162, 1996. In: NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4th Ed: Editora John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. p 174, 2006.

DELLARCO, V. L.; MAVOURNIN, K. H.; TICE, R. R. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions, **Environ. Mutagen.** v. 7 p. 405–424, 1985.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 56 p. 911–918, 1996.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5-32, 2009.

DONG, X.; ZHU, L.; WANG, JINHUA; et al. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 404-12, 2009. Elsevier Ltd.

ERGENE, S.; CAVAŞ, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421-9, 2007.

EVANS, H. J. Cytogenet.: Overview. **Prog. Clin. Biol. Res.** 340B p. 301–323, 1990.

EVANS, H. J. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: SCOTT, D.; BRIDGES, B. A.; SOBELS, F. H. (Eds.), **Progress in Genetic Toxicology**, Elsevier North Holland Biomedical Press, p. 57–74, 1977.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZATTO, L. E. et al. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n.º. 4, p. 429-436, 2004.

FERRARO, MARCOS VINÍCIUS MOCELLIN. **Avaliação de três espécies de peixe – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais Bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**, Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba – PR, 2009.

GABBIANELLI, R.; LUPIDI, G.; VILLARINI, M.; FALCIONI, G. DNA Damage Induced by Copper on Erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and Mollusk *Scapharca inaequivalvis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 3, p. 350 -356, 2003.

GABUCHYAN, V.V. Impaired mechanism of the reproductive function in copper chloride exposed white male rats. **Gig.Tr. Prot. Zabol.**, v. 9, p. 28-31, 1987. In: CHATTOPADHYAY, A.; SARKAR, M.; BISWAS, N. M. Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 3, p. 392-400, 2005.

GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; et al. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65-74, 2003.

GHISI, N. D. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, MARCOS VINÍCIUS MOCELLIN; et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental monitoring and assessment**, 2010.

GOMES, L. DE C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GONTIJO, A. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G. et al. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v. 534 p.165–172, 2003.

GRASSI, M. T. ; SHI, B. ; ALLEN, H. E. Partition of copper between dissolved and particulate phases using aluminum oxide as an aquatic model phase: effects of pH, solids and organic matter. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 516-524, 2000.

GRAVES, G. A.; WAN, Y.; FIKE, D. L. Water quality characteristics of storm water from major land uses in South Florida. **J AmWater Resour Assoc**; v. 40:1, p. 405-19, 2004.

GRISOLIA, C. K. (2005). **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, 392 p.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 1980. In: GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30 p. 179-185, 2000.

GUO, L.; HUNT, B. J.; SANTACHI, P. H.; RAY, S. M. Effect of Dissolved Organic Matter on the Uptake of Trace Metals by American Oysters. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 885-893, 2001.

GUTTENBACH, M.; SCHMID, M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, **Exp. Cell Res.** v. 211 p. 127-132, 1994.

HALL, L. W.; ANDERSON, R. D. A Deterministic Ecological Risk Assessment for Copper in European Saltwater Environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 207-218, 1999.

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5476-80, 2002.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; et al. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 PPB in American Leopard Frogs (*Rana Pipiens*): Laboratory and Field Evidence. **Environmental Health Perspectives**, , n. 4, p. 568-575, 2003.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; et al. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 895-6, 2002.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pinnata* by ethyl ethanesulphonate. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 104, p. 147–152, 1982.

HOSE, J.E., CROSS, J., SMITH, S.G., DICHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. **Mar. Environ. Res.** v. 22. p. 167–176, 1987.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. (1992) **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers.

INCEER, H.; AYAZ, S.; BEYAZOĞLU, O.; EMINE, S. Cytogenetic Effects of Copper Chloride on the Root Tip Cells of *Helianthus annuus* L. **Turk J Bio**, v. 27, p. 43-46, 2003.

INCEER, H.; BEYAZOĞLU, O. Cytogenetic Effects of Copper Chloride on the Root Tip Cells of *Vicia hirsuta* (L.) S. F. Gray. **Turk J Biol**, v. 24, p. 553-559, 2000.

IPCS. Copper: Environmental Health Criteria 200, Geneva, **International Programme on Chemical Safety**. World Health Organisation, 1998.

JACOMINI, A. E. **Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves límnicos *Anodontides trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-21, 2008.

JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846-52, 2010. Elsevier Ltd.

KATSUMITI, A.; DOMINGOS, F. X. V.; AZEVEDO, M.; et al. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 152, n. 1-4, p. 209-22, 2009.

KELLY, J. R., HARWELL, M. A. Indicators of ecosystem response and recovery, 1989. In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa Editora, São Carlos, 2006.

KERSANACH, M. W.; ANDRADE, C. F. F.; ZHANG, H.; et al. In situ Measurement of Trace Metals in Estuarine Waters of Patos Lagoon using Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, n. 2, p. 333, 2009.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus* sp (cascudo)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

KLIGERMAN, A. D.; DOERR, C. L.; TENNANT, A. H.; PENG, B. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. **Mutation research**, v. 471, n. 1-2, p. 107-12, 2000.

KLIGERMAN, A. D.; DOERR, C. L.; TENNANT, A. H.; ZUCKER, R. M. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. In vitro studies. **Mutation research**, v. 465, n. 1-2, p. 53-9, 2000.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity Study Group Communications**, v. 3, p. 103–115, 1995.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; BAO, V. W. W.; LEE, J.-S. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. **Marine pollution bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 632-6, 2008.

LANGSTON, W. J.; CHESMAN, B. S.; BURT, G. R.; POPE, N. D.; McEVOY, J. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? **Marine Environmental Research**, v. 53, p. 263–293, 2002.

LIOI, M. B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; et al. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 39-46, 1998.

LONDOÑO, D. K. **Biochemical and molecular effects of atrazine exposure in *Chironomus tentans* and *Pimephales promelas***, Tese de Doutorado, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska – USA, 2005.

LUNDBERG, J. G., BORNBUSCH, A. H., MAGO-LECCIA, F. *Gladioglanis conquistador* n. sp. From Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*. p.190–209, 1991. In: NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4th Ed: Editora John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. p 174, 2006.

MARONI, M. Introduction. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 5-118, 2000.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1-2, p. 75-88, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, Sep. 2005.

MERIAN, E. **Metals and their Compounds in the Environment**, Ed. VCH: Weinheim, 1991. In: GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; et al.

Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65-74, 2003.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 367, n. 4, p. 245-251, 1996.

MIOTA, F.; SIEGFRIED, B. D.; SCHARF, M. E.; LYDY, M. J. Atrazine induction of cytochrome P450 in *Chironomus tentans* larvae. **Chemosphere**, v. 40, n. 3, p. 285-91, 2000.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation research**, v. 399, n. 2, p. 135-47, 1998.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation research**, v. 552, n. 1-2, p. 247-68, 2004.

MORON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R. F.; RIBAS, J. L. C.; TAKAHASHI, H. K. Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. cap. 17, p. 413-432 In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa Editora, São Carlos, 2006.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4th Ed: Editora John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. p 174, 2006.

NIMMO, D.R. Pesticides, in: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Eds.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, Hemisphere, New York, p. 335–373, 1985.

NUNES, P. M. Q.; FOIZER, E. R.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R. Avaliação da toxicidade do cobre para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*, Garavello & Britski, 1988) por meio de parâmetros leucocitários e enzimáticos. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 32, n. 1, p. 87-92, 2010.

NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2010.

OLIVE, P. L., BANATH, J. P. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p. 23–29, 2006.

OSTLING, O., JOHANSON, K. L. Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 123, p. 291-298, 1984. In: PADRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356, 1995.

PADRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356, 1995.

PESAVENTO, M.; ALBERTI, G.; BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 129, 2009.

PIANCINI, L. D. S. **Biomonitoramento do rio Iguaçu em dois pontos utilizando como bioindicador peixes do gênero *Astyanax* (Characiforme, Characidae)**. Monografia, UFPR, Curitiba, 2008.

PRÜTZ, W. A.; BUTTLER, J.; LAND, E. J. Interaction of copper(I) with nucleic acids. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 58 n° 2, p. 215-234, 1990.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 158, n. 1-4, p. 77-85, 2009.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**, Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2007.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. D. S. F.; FERRARO, M. V. M.; et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation research**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.

RIBEIRO, R. L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas- RS. Editora da ULBRA. 356p, 2003.

RYDEBERG, B.; JOHANSON, K. B. Estimation of DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. **Radiation Research**, v. 81, p. 492-495, 1978. In: PADRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356, 1995.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 484-491, 1998.

SALABERRIA, I.; HANSEN, B. H.; ASENSIO, V.; et al. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 234, n. 1, p. 98-106, 2009. Elsevier Inc.

SANGI, M. R.; HALSTEAD, M. J.; HUNTER, K. A. Use of the diffusion gradient thin film method to measure trace metals in fresh waters at low ionic strength. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, p. 241, 2002.

SAVAGE, J. R. K. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations, **Env. Mol. Mutagen.** v. 22 p. 198–207, 1993.

SCALLY, S.; DAVISON, W.; ZHANG, H. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 222, 2006.

SCHEFFER, E. W.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, MARCO T. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 332-338, 2007.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHI, B.; ALLEN, H. E.; GRASSI, MARCO TADEU; MA, H. Modeling copper partitioning in surface waters. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3756-3764, 1998.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Tese de Doutorado, 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SODRÉ, F. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, MARCO T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 695-700, 2004.

SOLOMON, K. R.; BAKER, D. B.; RICHARDS, R. P. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 31-74, 1996.

SONG, Y.; ZHU, L. S.; WANG, J. H.; LIU, W.; XIE, H. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 905-909, 2009. Elsevier Ltd.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 113, p. 203-12, 1999.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p. 8-12, 2009. Elsevier Inc.

STANDARD methods for examination of water and wastewater 21st edition, 2005. Chapter 3000, p. 3-17 – 3-19; Method 3111 B.

STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E., Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic toxicology; Molecular*,

Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87-206, 1994. In: VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13 p. 57-149, 2003.

STUMM, W.; MORGAN, J. J.; **Aquatic chemistry**, 3rd ed., Wiley: New York, 1996. In: SHEFFER, E. W., SODRÉ, F. F., GRASSI, M. T. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. **Química Nova**, v. 30, n.º. 2, p. 332-338, 2007.

TARIFENO-SILVA, E.; KAWASAKI, L.; YN, D. P.; et al. Aquacultural approaches to recycling dissolved nutrients in secondarily treated domestic waste waters: uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. **Water Research**, v.16, p.59-65, 1982.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TENNANT, A.; PENG, B.; KLIGERMAN, A. D. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 493, n. 1-2, p. 1-10, 2001.

THOMPSON, F. Effect of triazines on energy relations of mitochondria and chloroplasts. **Weed Science**, v. 22, p. 164-166, 1974.

TILLITT, D. E.; PAPOULIAS, D. M.; WHYTE, J. J.; RICHTER, C. A. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 99, n. 2, p. 149-59, 2010.

TOMITA, R.Y., BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico** v. 64 p. 135–142, 2002. In: CAVALCANTE, D. G. S. M., MARTINEZ, C. B. R., SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 655 p. 41–46, 2008.

TORRE, M.C.A.; BEAULIEU, P.Y.; TESSIER, A. In situ measurement of trace metals in lake water using the dialysis and DGT techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 418, p. 53, 2000.

TWISS, M.R.; MOFFETT, J.W. Comparison of coppers Speciation in coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin-film techniques. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 1061, 2002.

UNIÃO EUROPÉIA concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. **Official Journal of the European Union** (2004/248/EC), 2004.

U.S. EPA Office of Water. **Aquatic life ambient freshwater quality criteria—copper**. 2007 Revision. EPA-822-R-07-001 (CAS Registry Number 7440-50-8), 2007.

U.S. EPA Atrazine Science Reevaluation: Potential Health Impacts, 2009. Disponível em: http://www.epa.gov/opp00001/reregistration/atrazine/atrazine_update.htm

- VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 178-89, 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.
- VAZQUEZ, M. Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. **Chemosphere**, v. 39, n. 7, p. 1211-1224, 1999.
- VELA, N. P.; OLSON, L. K.; CARUSO, J. A. Elemental speciation with plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 585-597, 1993.
- VENTURA, B. D. C.; DE ANGELIS, D. D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 1, p. 42-51, 2008.
- VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**, v.1, p.295, 1989.
- VILLELA, I. V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H. C., SILVEIRA, J. D., Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Eds, p. 321, 1997.
- WARREN, L. A.; HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments, **Earth-Science Reviews**, v. 54, p. 261-320, 2001.
- WHO, World Health Organization, Geneva. Guidelines for Drinking Water Quality, second edition, vol. 2, **Health Criteria and Other Supporting Information**, p. 283, 1998.
- WU, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Studies on semen quality in workers exposed to manganese and electric welding. *Chung. Hua. Yu. Fang. I.Hsuch. Tsa. Chih.* v. 30(5), p. 266-271, 1996. In CHATTOPADHYAY, A.; SARKAR, M.; BISWAS, N. M. Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 3, p. 392-400, 2005.
- XING, H.; HAN, Y.; LI, S.; et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1666-70, 2010a. Elsevier.
- XING, H.; WANG, JINTAO; LI, J.; et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and Carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 26-30, 2010b. Elsevier B.V.

YADAV, K. K.; TRIVEDI, S. P. Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after in vivo exposure to three heavy metals. **Mutation research**, v. 678, n. 1, p. 7-12, 2009.

ZHANG, G.; DAVISON, W. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4447, 2000.

APÊNDICES

MATERIAL E MÉTODOS

ORGANISMO A SER UTILIZADO

O Jundiá, ou *Rhamdia quelen*, foi utilizado por este ser um peixe de ampla distribuição no país. Essa espécie também foi escolhida por ser adequada a bioensaios, pois é um organismo fácil de manter sob condições laboratoriais.

O *Rhamdia quelen* vem sendo utilizado em bioensaios (CERICATO et al., 2009; FERRARO, 2009; GHISI et al., 2010; RAMSDORF et al., 2009a) de genotoxicidade a alguns anos, e vem se mostrando um bom organismo biomonitor para se avaliar a ecotoxicidade de diversos compostos.

OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais utilizados foram adquiridos de uma piscicultura, localizadas na cidade de Toledo – PR, cujo nº da licença de operação fornecida pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) é 16624. Tais animais foram adquiridos através de uma revenda situada na Central de Abastecimento (CEASA), em Curitiba – PR. Os peixes foram trazidos até a sala de bioensaios do laboratório de citogenética animal e metagênese ambiental da UFPR, onde foram mantidos em tanques contendo 250 L de água filtrada e constantemente aerada. Os peixes foram mantidos nessas condições por um mês, até o momento da realização dos experimentos, quando foram transferidos para aquários de 108 L.

MÉTODOS

BIOENSAIOS

Ambos contaminantes foram administrados por via hídrica, ou seja, foram misturados à água do aquário. Em cada bioensaio foram utilizados 80 peixes divididos em 4 grupos distintos, um controle negativo (sem a adição de qualquer tipo de produto à água) e três

grupos com diferentes doses dos contaminantes. Cada um desses grupos permaneceu em um aquário de 107 L durante as 96 horas de duração dos bioensaios.

A Atrazina foi administrada nas doses de 2, 10 e 100 µg por 1000 mL de água. A água dos quatro aquários não foi trocada durante o bioensaio, e os peixes não foram alimentados durante esse tempo. Após as 96 horas de contaminação, os animais foram retirados dos aquários e anestesiados com benzocaína 10%, que segundo GONTIJO et al., 2003, não causa efeitos genotóxicos em peixes, e então foram sacrificados para a coleta do material biológico de interesse. De cada animal foi retirada uma alíquota de sangue para a realização do teste do micronúcleo pístico e ensaio cometa com células sanguíneas, e também o primeiro arco branquial do lado direito do peixe para a realização do ensaio cometa deste tecido, que está em contato direto com a água contaminada.

O mesmo procedimento foi seguido no bioensaio de contaminação com o Cloreto de Cobre, no entanto foram utilizadas diferentes concentrações: 2, 9 e 18 µg/L.

TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCIO (MNP)

Para se verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por HOOFTMAN e RAAT (1982), com algumas modificações. A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas:

- Lâminas são bem limpas e identificadas.
- Ao se coletar o sangue do animal, pinga-se uma gota na superfície da lâmina.
- Com o auxílio de uma lamínula, é feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina, sempre em um único sentido apenas.
- As lâminas, após secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96%, por 30 minutos.
- As lâminas são então coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 7,6), por 12 minutos.
- As lâminas foram analisadas em teste cego, sendo que, foram analisadas 2000 células de cada animal. Na análise, são consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta. São considerados como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal não excederem 1/3 do seu tamanho, estiverem nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas

nucleares também foram analisadas segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) e computadas como alterações morfológicas nucleares.

ENSAIO COMETA

A técnica utilizada neste trabalho foi a descrita por SPEIT e HARTMANN (1999).

ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE

Procedimento utilizado para a montagem e análise das lâminas:

- Foram coletados 10 µL de sangue de cada animal e misturados com 1 mL de soro bovino fetal. Desta solução, coletou-se 10 µL de suspensão celular que foram misturadas com 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- Colocou-se essa mistura sobre uma lâmina previamente coberta com agarose normal.
- Cobriu-se a lâmina com uma lamínula, que então foi levada a geladeira por 15 minutos.
- Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirou-se delicadamente as lamínulas.
- As lâminas foram colocadas em solução de lise dentro de cubetas de acrílico (completamente envoltas em papel alumínio de modo a evitar ao máximo o contato com a luz), e mantidas em refrigerador por 24 horas,
- Após esse tempo, foi preparada a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) em ambiente escuro.
- As lâminas foram retiradas das cubetas onde estavam na solução de lise e foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese. Quando necessário, os espaços vazios na cuba foram preenchidos com lâminas limpas.
- Na cuba de eletroforese, adicionou-se suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas.
- As lâminas foram mantidas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.
- Iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 minutos.
- Terminada a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e então tiveram seu pH neutralizado com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos.
- Repetiu-se o banho de neutralização por mais duas vezes.

- As lâminas foram deixadas em posição inclinada para secagem, e após isso foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos.

- As lâminas foram estocadas até o momento da análise, quando foram coradas com 15 µL de brometo de etídeo, cobertas com lamínula e levadas a análise.

- A análise foi feita em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 nucleóides por lâmina.

- Os nucleóides foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a eletroforese. Os nucleóides foram classificados em 4 classes distintas: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo).

- Os escores foram calculados através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe, como mostrado na fórmula a seguir:

$$\text{Escore} = [(0 \times \text{n}^{\circ} \text{ dano } 0) + (1 \times \text{n}^{\circ} \text{ dano } 1) + (2 \times \text{n}^{\circ} \text{ dano } 2) + (3 \times \text{n}^{\circ} \text{ dano } 3) + (4 \times \text{n}^{\circ} \text{ dano } 4)]$$

ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE BRÂNQUIA

O procedimento para montagem das lâminas com células da brânquia consistem das seguintes etapas:

- Foi retirado, do lado direito do peixe, o primeiro arco branquial de cada animal.

- Com o auxílio de um bisturi, as lamelas foram separadas do arco e lavadas com PBS para se retirar o máximo possível de sangue da amostra.

- O tecido foi acondicionado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Esses microtubos foram armazenados sob refrigeração e na ausência de luz.

- O tecido foi desagregado a ~15.000 rpm por cerca de 30 segundos, com o auxílio de um homogeneizador Tecnal – TE-103.

- Coletou-se 10 µL do homogeneizado obtido, que foi misturado com 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

- As lâminas foram montada de acordo com o protocolo já descrito para células sanguíneas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando que os dados obtidos não se distribuem em uma curva normal e as amostras são independentes (não apresentam qualquer grau de irmandade ou parentesco conhecido), os dados foram analisados por testes estatístico não paramétrico. Kruskal-Wallis quando comparamos mais de duas amostras independentes e Mann-Whitney, quando foram comparadas duas amostras independentes. Nas análises entre tecidos, ou quando comparadas as frequências dos diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares, utilizamos testes não paramétricos para amostras dependentes: Friedman, quando comparamos mais de duas amostras e Wilcoxon, quando comparadas duas amostras. As análises foram feitas com o programa computacional BioEstat 5.0.

PREPARAÇÕES PRÉVIAS DO ENSAIO COMETA

Antes da coleta do material para análise, são preparadas as lâminas com cobertura de agarose, a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e todos os reagentes necessários, segundo as etapas descritas a seguir:

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Dissolver 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas.
- b) Colocar para aquecer.
- c) Após fervura, deixar solidificar a temperatura ambiente.
- d) Picar a agarose em pedaços e voltar a ferver.
- e) Repetir as etapas “c” e “d”.
- f) Levar para banho-maria a 70°C, o banho deve ficar no nível da agarose.
- g) Mergulhar as lâminas, previamente limpas com etanol, na agarose até alcançar a parte esmerilhada. Procurar fazer uma camada fina de agarose.
- h) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada.
- i) Secar a lâmina “overnight” em temperatura ambiente na horizontal. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- Dissolver 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 ml de PBS.
- Colocar para aquecer com agitação constante.
- Desligar o aquecedor quando levantar fervura e manter a agitação até diminuir a temperatura da agarose.
- Desligar o agitador e deixar solidificar a temperatura ambiente.
- Manter em geladeira até o momento do uso.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Solução de Lise – Estoque

Para 1000 mL de solução estoque:

890 mL de água destilada ou milique ou deinizada.

146,1 g de Cloreto de Sódio - NaCl (2,5 M).

37,2 g de Acido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24).

1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14).

8 g de Hidróxido de Sódio sólido (NaOH PM 40,0).

- Dissolver os reagentes em 890 mL de água.
- Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10.
- Adicionar 10 g de Lauril Sarcosinato de Sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

Solução de Lise – Uso

Para 100 mL de solução de uso:

1 mL de Triton X – 100.

10 mL DMSO.

89 mL solução estoque.

- Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 mL;
- Fazer e manter sempre no escuro.

Tampão de Eletroforese

Solução de NaOH (300 mM):

19,2 g de NaOH.

48 mL de água deionizada.

a) Agitar.

Solução Estoque de Acido Etilenodiaminotetracético - EDTA (200 Mm)

14,89 mL de EDTA.

200 mL de água deionizada.

- Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH.
- A solução pode ser estocada.

Solução de uso:

1600 mL de água deionizada gelada (4°C).

8 mL de EDTA (200 Mm).

48 mL da solução de NaOH.

- Acertar o pH para maior 13 com pastilhas de NaOH.

Tampão de Neutralização

51,04 g de TRIS.

1000 mL de água deionizada.

- Acertar o pH para 7,5 com Acido clorídrico (HCL).

Solução de Coloração – Estoque

10 mg de Brometo de Etídio.

50 mL de água deionizada.

Solução de Coloração – Uso

1 mL de solução estoque.

9 mL de água deionizada.

PBS

0,2 g de Cloreto de potássio – KCl (PM 74,55).

0,2 g de Fosfato de potássio monobásico – KH_2HPO_4 (PM 136,09).

8 g de Cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44).

1,15 g de Hidrogênio-fosfato disódico anidro - NaHPO_4 (PM 141,96).

1000 mL de água deionizada.

- Fazer em balão volumétrico de 1000 mL.

- Acrescentar a água até alcançar a marca do balão volumétrico.

- Acertar o pH para 7,4.

- Estocar em refrigerador.

TABELAS

Experimento Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina								Concentração: Controle													
Características					AMN			Ensaio Cometa													
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor- mais	Total	Eritrócitos							Brânquias						
								Classes							Classes						
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	F	11.60	9.60	9.00	3	1997	2000	54	23	16	4	3	100	79	10	8	10	25	47	100	291
2	M	12.70	9.70	14.70	11	1989	2000	50	25	14	10	1	100	87	2	1	4	38	55	100	343
3	-	10.90	8.90	7.83	4	1996	2000	76	12	4	5	3	100	47	7	11	4	24	54	100	307
4	M	11.70	9.70	11.40	3	1997	2000	87	13	0	0	0	100	13	40	30	10	11	9	100	119
5	M	16.00	13.00	33.68	2	1998	2000	49	40	9	2	0	100	64	22	24	11	19	24	100	199
6	-	11.90	9.50	13.84	11	1989	2000	51	48	1	0	0	100	50	14	20	16	23	27	100	229
7	M	14.50	11.60	18.49	2	1998	2000	97	3	0	0	0	100	3	70	16	4	5	5	100	59
8	M	23.80	16.80	71.20	8	1992	2000	96	4	0	0	0	100	4	83	9	7	1	0	100	26
9	M	13.50	11.50	17.30	11	1989	2000	91	9	0	0	0	100	9	15	25	20	34	6	100	191
10	M	13.50	11.00	14.82	11	1989	2000	84	14	1	1	0	100	19	47	21	8	12	12	100	121
11	-	15.10	12.10	23.15	13	1987	2000	20	40	30	10	0	100	130	58	18	10	9	5	100	85
12	-	10.20	8.60	8.51	1	1999	2000	53	28	17	2	0	100	68	38	18	7	12	25	100	168
13	-	12.30	9.90	13.40	3	1997	2000	6	26	47	19	2	100	185	45	19	10	12	14	100	131
14	M	15.10	12.10	20.47	1	1999	2000	74	24	0	0	2	100	32	60	16	7	11	6	100	87
15	M	12.90	10.40	15.00	6	1994	2000	16	52	19	13	0	100	129	45	25	10	12	8	100	113
16	F	16.40	13.20	26.15	8	1992	2000	64	35	1	0	0	100	37	62	19	4	9	6	100	78
17	F	14.70	12.00	21.45	3	1997	2000	59	32	8	1	0	100	51	5	25	53	10	7	100	189
18	F	10.80	8.90	9.36	4	1996	2000	81	17	2	0	0	100	21	60	23	3	7	7	100	78
19	F	13.90	11.80	18.95	6	1994	2000	73	19	4	2	2	100	41	69	14	5	7	5	100	65
20	-	11.20	9.10	8.29	3	1997	2000	88	12	0	0	0	100	12	85	5	3	7	0	100	32
Média		13.64	10.97	18.85	5.7	1994		63.45	23.8	8.65	3.45	0.65		54.05	41.85	17.35	10.3	14.4	16.1		145.55
Mediana		13.2	10.7	14.91	4	1996		68.5	23.5	3	1	0		44	45	18.5	7.5	11.5	7.5		120

Experimento Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina							Concentração: 2 µg/L															
Características					AMN			Ensaio Cometa														
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alter- ções	Nor- mais	Total	Eritrócitos							Brânquias							
								Classes							Classes							
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore	
1	F	12.50	10.00	14.80	18	1982	2000	10	2	1	22	65	100	330	66	13	3	6	12	100	85	
2	M	14.80	11.70	18.00	9	1991	2000	85	15	0	0	0	100	15	58	16	2	12	12	100	104	
3	-	10.00	8.20	6.80	-	-	-	87	13	0	0	0	100	13	87	6	3	4	0	100	24	
4	F	16.00	12.90	26.00	6	1994	2000	53	37	9	0	1	100	59	29	17	6	26	22	100	195	
5	M	14.70	11.80	21.00	6	1994	2000	63	33	3	1	0	100	42	30	24	13	22	11	100	160	
6	F	18.40	14.80	50.50	6	1994	2000	54	37	9	0	0	100	55	87	7	0	0	6	100	31	
7	M	11.50	9.10	10.00	15	1985	2000	48	42	9	1	0	100	63	79	12	5	3	1	100	35	
8	F	11.00	8.80	10.80	3	1997	2000	43	34	15	8	0	100	88	20	15	26	25	14	100	198	
9	F	20.40	18.00	67.00	7	1993	2000	19	35	38	8	0	100	135	31	22	12	24	11	100	162	
10	-	11.70	8.70	7.80	4	1996	2000	10	4	23	54	9	100	248	81	11	5	3	0	100	30	
11	F	13.70	11.30	18.00	13	1987	2000	16	20	40	23	1	100	173	89	8	0	2	1	100	18	
12	M	12.90	10.40	12.90	6	1994	2000	11	33	34	14	8	100	175	81	12	4	2	1	100	30	
13	F	16.50	13.20	32.20	20	1980	2000	21	46	22	11	0	100	123	75	14	4	7	0	100	43	
14	F	9.90	8.00	6.00	-	-	-	40	44	13	3	0	100	79	73	9	2	7	9	100	70	
15	F	12.50	10.00	14.70	14	1986	2000	72	27	1	0	0	100	29	56	11	6	9	18	100	122	
16	F	11.90	9.70	13.20	17	1983	2000	14	38	25	23	0	100	157	73	10	11	4	2	100	52	
17	M	11.00	8.80	8.40	28	1972	2000	34	50	15	1	0	100	83	46	27	9	11	7	100	106	
18	-	11.60	9.30	18.70	31	1969	2000	77	23	0	0	0	100	23	72	17	3	5	3	100	50	
19	-	10.70	8.70	9.90	6	1994	2000	79	17	3	1	0	100	26	63	18	9	6	4	100	70	
20	-	10.50	8.30	7.00	10	1990	2000	83	15	1	1	0	100	20	82	11	4	3	0	100	28	
Média		13.11	10.59	18.69	12.17	1987.83		45.95	28.3	13.1	8.55	4.2		96.8	63.9	14	6.35	9.05	6.7		80.65	
Mediana		12.2	9.85	13.95	9.5	1990.5		45.5	33	9	1	0		71	72.5	12.5	4.5	6	5		61	

Experimento Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina							Concentração: 10 µg/L															
Características					AMN			Ensaio Cometa														
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor-mais	Total	Eritrócitos							Brânquias							
								Classes							Classes							
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore	
1	M	11.20	9.10	8.13	15	1985	2000	73	24	2	1	0	100	31	29	21	15	5	30	100	186	
2	M	17.00	13.60	33.00	10	1990	2000	8	29	33	21	9	100	194	73	12	5	5	5	100	57	
3	M	15.60	12.10	21.70	22	1978	2000	7	7	18	54	14	100	261	24	29	14	12	21	100	177	
4	M	17.00	12.60	32.00	7	1993	2000	11	12	42	29	6	100	207	48	19	4	15	14	100	128	
5	F	13.00	10.00	13.00	10	1990	2000	5	47	38	5	5	100	158	67	14	8	11	0	100	63	
6	M	11.10	9.00	14.70	9	1991	2000	4	2	6	72	16	100	294	58	18	8	8	8	100	90	
7	F	15.80	12.00	26.00	25	1975	2000	9	16	28	37	10	100	223	64	11	4	6	15	100	97	
8	-	13.00	10.00	12.15	13	1987	2000	33	48	14	5	0	100	91	15	11	9	30	35	100	259	
9	M	15.00	10.00	24.00	6	1994	2000	53	39	7	0	1	100	57	26	27	9	17	21	100	180	
10	F	11.00	9.20	9.40	9	1991	2000	8	3	21	59	9	100	258	42	33	3	5	17	100	122	
11	M	15.00	11.80	22.00	15	1985	2000	13	10	21	32	24	100	244	30	13	3	24	30	100	211	
12	F	14.40	9.20	19.40	-	-	-	11	21	32	31	5	100	198	58	16	12	14	0	100	82	
13	M	13.10	11.00	23.00	17	1983	2000	70	28	2	0	0	100	32	52	20	14	12	2	100	92	
14	M	18.00	11.00	47.00	10	1990	2000	12	2	27	47	12	100	245	62	26	5	6	1	100	58	
15	M	11.00	9.40	10.80	5	1995	2000	9	5	10	55	21	100	274	63	13	5	10	9	100	89	
16	F	13.00	10.00	18.00	12	1988	2000	81	14	5	0	0	100	24	61	10	6	11	12	100	103	
17	F	22.00	18.00	53.00	11	1989	2000	29	59	12	0	0	100	83	53	22	9	11	5	100	93	
18	M	11.50	9.50	9.55	17	1983	2000	78	18	1	1	2	100	31	46	15	13	19	7	100	126	
19	F	11.10	9.00	9.20	16	1984	2000	15	48	28	8	1	100	132	85	9	2	2	2	100	27	
20	-	9.90	8.60	7.48	9	1991	2000	50	44	6	0	0	100	56	69	10	2	10	9	100	80	
Média		13.94	10.76	20.68	12.53	1987.47		28.95	23.8	17.7	22.9	6.75		154.65	51.25	17.45	7.5	11.7	12.2		116	
Mediana		13.05	10	18.7	11	1989		12.5	19.5	16	14.5	5		176	55.5	15.5	7	11	9		95	

Experimento Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina								Concentração: 100 µg/L													
Características					AMN			Ensaio Cometa													
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor-mais	Total	Eritrócitos							Brânquias						
								Classes							Classes						
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	-	13.10	10.80	15.80	20	1980	2000	10	17	18	39	16	100	234	-	-	-	-	-	-	-
2	M	13.60	11.10	16.70	20	1980	2000	2	2	16	61	19	100	293	71	10	2	10	7	100	72
3	F	12.90	10.50	13.30	7	1993	2000	19	33	25	18	5	100	157	31	29	9	17	14	100	154
4	-	15.40	12.40	26.00	20	1980	2000	3	10	21	42	24	100	274	67	19	9	13	20	128	156
5	M	13.70	11.00	19.35	17	1983	2000	33	51	14	2	0	100	85	48	21	5	14	12	100	121
6	M	13.10	10.70	15.53	3	1997	2000	9	8	12	26	45	100	290	55	8	5	14	18	100	132
7	M	11.90	9.70	9.97	3	1997	2000	66	26	7	0	1	100	44	64	12	4	9	11	100	91
8	-	17.60	14.50	41.89	5	1995	2000	69	30	0	0	1	100	34	13	23	21	28	15	100	209
9	F	20.10	16.80	62.60	3	1997	2000	6	18	29	37	10	100	227	62	23	4	4	7	100	71
10	M	9.40	7.50	15.31	7	1993	2000	7	1	5	65	22	100	294	36	17	6	14	27	100	179
11	M	16.90	13.60	32.97	8	1992	2000	59	28	9	3	1	100	59	47	21	20	9	3	100	100
12	F	13.70	10.80	19.20	14	1986	2000	17	7	17	56	3	100	221	28	34	12	13	13	100	149
13	F	12.00	10.00	12.80	6	1994	2000	1	5	7	55	32	100	312	31	22	18	20	9	100	154
14	F	13.60	11.00	15.66	20	1980	2000	7	5	3	6	79	100	345	46	24	4	13	13	100	123
15	M	15.60	12.40	24.20	19	1981	2000	0	7	12	57	24	100	298	22	15	12	19	32	100	224
16	M	14.00	11.00	20.57	27	1973	2000	70	24	5	1	0	100	37	61	17	11	8	3	100	75
17	F	12.50	10.00	13.28	6	1994	2000	38	47	15	0	0	100	77	62	23	7	5	3	100	64
18	F	14.60	13.70	17.50	6	1994	2000	6	16	32	32	14	100	232	51	21	4	11	13	100	114
19	F	14.50	11.70	21.75	19	1981	2000	68	25	3	0	4	100	47	71	18	2	4	5	100	54
20	F	8.90	11.10	9.61	25	1975	2000	6	7	6	47	34	100	296	47	24	5	12	12	100	118
Média		13.86	11.52	21.2	12.75	1987.25		24.8	18.4	12.8	27.4	16.7		192.8	48.05	20.05	8.42	12.5	12.5		124.21
Mediana		13.65	11	17.1	11	1989		9.5	16.5	12	29	12		229.5	48	21	6	13	12		121

Experimento Semi-Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina								Concentração: 2 µg/L													
Características					AMN			Ensaio Cometa													
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor-mais	Total	Eritrócitos							Brânquias						
								Classes							Classes						
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	F	14.55	11.50	19.72	12	1989	2001	28	57	39	16	6	146	207	22	23	31	17	7	100	164
2	M	15.00	12.05	18.91	15	2006	2021	91	9	0	1	0	101	12	30	29	21	6	5	91	109
3	M	14.65	11.85	20.51	8	1993	2001	89	9	2	0	0	100	13	-	-	-	-	-	0	-
4	F	18.00	14.05	37.37	23	2121	2144	82	14	3	1	0	100	23	-	-	-	-	-	0	-
5	M	16.05	13.20	30.87	3	2015	2018	74	20	4	2	0	100	34	-	-	-	-	-	0	-
6	F	17.90	14.60	39.85	18	1982	2000	80	18	1	1	0	100	23	-	-	-	-	-	0	-
7	M	14.75	11.70	18.31	6	2014	2020	87	13	0	0	0	100	13	-	-	-	-	-	0	-
8	M	17.00	13.90	46.04	0	2023	2023	87	11	0	3	0	101	20	-	-	-	-	-	0	-
9	F	17.10	14.00	36.91	10	1990	2000	88	12	0	0	0	100	12	-	-	-	-	-	0	-
10	F	11.25	9.10	9.18	27	2005	2032	73	22	4	1	0	100	33	15	25	35	16	19	110	219
11	M	18.05	13.85	38.28	11	2039	2050	57	29	12	1	1	100	60	11	30	31	18	11	101	190
12	M	15.00	12.00	23.12				65	26	5	3	2	101	53	-	-	-	-	-	0	-
13	F	14.90	12.10	23.48				85	15	0	0	0	100	15	-	-	-	-	-	0	-
14	F	13.10	10.65	15.95				68	28	7	1	0	104	45	20	17	35	20	9	101	183
15	F	15.15	12.15	21.13				81	17	1	0	1	100	23	-	-	-	-	-	0	-
16	F	18.40	15.00	47.68				69	23	6	2	0	100	41	33	22	23	20	3	101	140
17	F	15.80	12.95	26.54				80	18	2	0	0	100	22	25	23	23	23	6	100	162
18	M	13.80	11.45	17.75				70	24	5	2	0	101	40	22	26	25	23	4	100	161
19	M	14.80	12.00	21.98				81	18	2	0	0	101	22	31	34	19	14	2	100	122
Média		15.54	12.53	27.03	12.09	2016.09		75.53	20.2	4.89	1.79	0.53		37.421	23.22	25.44	27	17.4	7.33		161.11
Mediana		15	12.1	23.12	11	2006		80	18	2	1	0		23	22	25	25	18	6		162

Experimento Semi-Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina								Concentração: 10 µg/L													
Características					AMN			Ensaio Cometa													
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor-mais	Total	Eritrócitos							Brânquias						
								Classes							Classes						
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	F	12.40	10.18	13.08	13	2032	2045	50	29	16	6	0	101	79	88	6	1	4	1	100	24
2	F	17.45	14.00	41.12	4	1999	2003	66	28	6	0	0	100	40	70	20	12	5	4	111	75
3	F	12.30	11.23	11.85	-	-	-	66	28	4	2	0	100	42	62	22	10	3	3	100	63
4	F	15.50	12.40	24.46	21	1980	2001	87	13	0	0	0	100	13	60	18	9	8	5	100	80
5	F	16.00	12.92	26.97	14	2024	2038	45	40	14	1	0	100	71	80	12	6	1	2	101	35
6	F	13.70	11.20	18.26	1	2008	2009	41	53	16	1	0	111	88	65	17	11	4	3	100	63
7	M	15.40	12.30	25.53	29	1985	2014	90	9	1	0	0	100	11	79	10	2	3	6	100	47
8	M	16.45	13.20	31.47	4	2007	2011	93	3	4	0	0	100	11	97	22	5	6	2	132	58
9	M	15.45	12.25	22.41	8	2024	2032	74	23	2	1	0	100	30	66	23	5	8	0	102	57
10	F	13.30	10.80	15.82				78	18	3	1	0	100	27	70	20	7	21	1	119	101
11	F	18.15	14.60	44.85				71	20	5	3	1	100	43	71	23	3	2	2	101	43
12	F	13.30	10.80	15.40				58	32	7	3	0	100	55	64	23	8	4	1	100	55
13	F	13.60	14.60	17.36				36	42	16	3	3	100	95	70	12	5	6	7	100	68
14	F	15.05	10.80	20.98				27	24	23	20	6	100	154	50	22	14	11	3	100	95
15	F	14.50	10.90	18.64				75	21	3	1	0	100	30	65	17	10	7	2	101	66
16	F	13.00	11.90	14.35				48	38	12	2	0	100	68	86	8	5	9	4	112	61
17	F	14.30	11.65	19.41				50	41	7	2	0	100	61	76	7	7	6	4	100	55
18	F	15.45	12.45	26.18				77	21	1	1	0	100	26	53	27	7	6	8	101	91
19	F	13.60	11.15	18.88				40	44	14	3	0	101	81	74	15	6	3	3	101	48
Média		14.68	12.07	22.47	11.75	2007.38		61.68	27.7	8.11	2.63	0.53		53.947	70.84	17.05	7	6.16	3.21		62.368
Mediana		14.5	11.9	19.41	10.5	2007.5		66	28	6	1	0		43	70	18	7	6	3		61

Experimento Semi-Estático: Exposição à Atrazina por 96 horas

Xenobionte: Atrazina								Concentração: 100 µg/L													
Características					AMN			Ensaio Cometa													
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Alterações	Nor-mais	Total	Eritrócitos							Brânquias						
								Classes							Classes						
								0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	F	16.70	13.50	30.97	19	1982	2001	-	-	-	-	-	0	-	6	12	29	37	15	99	241
2	M	17.00	13.80	33.53	2	2095	2097	76	13	7	4	0	100	39	27	22	33	14	4	100	146
3	M	14.40	11.50	21.19	9	1991	2000	-	-	-	-	-	0	-	28	17	17	26	12	100	177
4	F	15.10	12.10	25.08	3	1997	2000	-	-	-	-	-	0	-	31	19	22	26	3	101	153
5	M	16.00	12.90	28.75	3	2005	2008	-	-	-	-	-	0	-	26	16	28	21	9	100	171
6	F	13.30	10.70	15.62	7	1993	2000	-	-	-	-	-	0	-	25	19	23	20	14	101	181
7	M	14.50	11.60	20.23	8	2005	2013	-	-	-	-	-	0	-	12	15	29	26	18	100	223
8	M	13.50	10.90	15.19	11	1990	2001	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
9	M	12.95	10.30	14.24	17	1984	2001	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
10	F	17.30	14.10	44.36				-	-	-	-	-	0	-	27	29	16	21	7	100	152
11	M	14.85	12.05	22.48				-	-	-	-	-	0	-	36	14	17	24	9	100	156
12	M	13.60	11.30	14.16				-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
13	F	18.50	15.50	57.19				-	-	-	-	-	0	-	43	16	14	20	7	100	132
14	F	16.90	13.60	30.92				-	-	-	-	-	0	-	28	22	29	17	4	100	147
15	M	18.60	15.10	51.01				-	-	-	-	-	0	-	30	29	22	11	9	101	142
16	-	11.60	9.40	8.91				-	-	-	-	-	0	-	18	27	26	25	4	100	170
17	M	15.70	12.60	27.00				-	-	-	-	-	0	-	30	27	19	18	5	99	139
18	F	14.30	11.50	18.92				-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
19	M	11.35	9.15	8.49				-	-	-	-	-	0	-	26	16	25	23	10	100	175
20	F	12.70	10.40	13.70				-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
Média		14.94	12.1	25.1	8.78	2004.67		76	13	7	4	0		39	26.2	20	23.3	21.9	8.67		167
Mediana		14.68	11.83	21.84	8	1993		76	13	7	4	0		39	27	19	23	21	9		156

Experimento Semi-Estático - Controle utilizado para os experimentos com Atrazina e Cloreto de Cobre

Xenobionte: Atrazina e Cloreto de Cobre					Concentração: Controle								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	M	15.00	12.00	20.40	9	0	0	0	0	0	9	2011	2020
2	M	17.20	14.00	37.51	0	1	0	0	0	0	1	2014	2015
3	F	18.05	14.90	41.13	13	3	1	1	0	0	18	2059	2077
4	F	16.80	13.70	33.86	14	2	0	0	0	0	16	2005	2021
5	M	12.60	10.40	13.30	27	19	10	11	1	0	68	1938	2006
6	F	17.30	14.10	33.23	14	7	4	1	0	0	26	1991	2017
7	M	19.45	17.80	41.27	2	0	0	0	0	1	3	2029	2032
8	M	15.70	12.70	27.75	2	0	0	0	0	0	2	1998	2000
9	M	16.60	13.40	28.56	16	15	3	2	1	0	37	1966	2003
10	M	12.75	10.45	13.28	11	2	0	0	1	0	14	2019	2033
11	M	12.55	10.05	12.42									
12	F	16.55	13.25	31.73									
13	M	15.80	13.10	27.05									
14	M	19.75	16.05	55.61									
15	M	16.40	13.30	29.43									
16	F	19.85	16.10	60.20									
17	F	16.60	13.30	29.49									
18	M	15.00	12.31	23.99									
19	M	17.30	13.90	34.64									
20	M	12.40	10.35	14.64									
Média		16.18	13.26	30.47	10.80	4.90	1.80	1.50	0.30	0.10	19.40		
Mediana		16.58	13.3	29.46	12	2	0	0	0	0	15		

Continuação da tabela: Experimento Semi-Estático - Controle utilizado para os experimentos com Atrazina e Cloreto de Cobre

Xenobionte: Atrazina e Cloreto de Cobre								Concentração: Controle						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	72	17	8	3	0	100	42	-	-	-	-	-	0	-
2	69	19	10	3	0	101	48	54	13	7	14	12	100	117
3	83	17	0	0	0	100	17	50	17	13	11	9	100	112
4	74	12	8	4	2	100	48	68	15	26	18	8	135	153
5	-	-	-	-	-	0	-	45	24	19	10	2	100	100
6	83	7	6	4	0	100	31	54	20	12	14	1	101	90
7	87	9	2	0	2	100	21	32	14	29	18	7	100	154
8	86	10	3	1	0	100	19	50	17	12	18	3	100	107
9	94	6	0	0	0	100	6	-	-	-	-	-	0	-
10	86	8	5	1	0	100	21	50	20	17	22	13	122	172
11	85	12	1	0	2	100	22	16	31	15	26	12	100	187
12	70	27	1	2	0	100	35	41	10	8	24	20	103	178
13	-	-	-	-	-	0	-	67	10	15	5	3	100	67
14	79	14	4	2	1	100	32	54	12	19	9	5	99	97
15	-	-	-	-	-	0	-	67	12	14	8	1	102	68
16	95	5	0	0	0	100	5	65	19	11	6	1	102	63
17	80	12	5	3	0	100	31	60	14	11	16	4	105	100
18	-	-	-	-	-	0	-	44	20	18	15	3	100	113
19	88	9	2	1	0	100	16	45	12	20	16	7	100	128
20	82	15	0	2	1	100	25	48	16	19	11	6	100	111
	82.06	12.4	3.44	1.63	0.5		26.188	50.56	16.44	15.8	14.5	6.5		117.61
	83	12	2.5	1.5	0		23.5	50	15.5	15	14.5	5.5		111.5

Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 2 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	F	12.22	10.00	11.28	6	6	0	0	0	0	12	1989	2001
2	F	13.30	10.90	13.23	9	1	1	4	0	0	15	2006	2021
3	M	11.70	9.40	10.03	6	1	1	0	0	0	8	1993	2001
4	M	10.70	8.65	8.00	17	3	3	0	0	0	23	2121	2144
5	F	16.60	13.70	30.83	2	1	0	0	0	0	3	2015	2018
6	F	14.70	11.95	21.73	10	7	0	0	0	1	18	1982	2000
7	M	12.00	9.75	11.42	4	2	0	0	0	0	6	2014	2020
8	M	16.30	13.30	25.52	0	0	0	0	0	0	0	2023	2023
9	F	12.30	10.05	10.56	10	0	0	0	0	0	10	1990	2000
10	F	12.80	10.75	7.43	12	7	6	2	0	0	27	2005	2032
11	M	12.60	10.30	13.06	9	2	0	0	0	0	11	2039	2050
12	M	12.30	10.00	12.04									
13	M	11.29	9.00	8.03									
14	F	11.40	9.20	9.69									
15	M	11.00	9.10	7.86									
16	F	13.00	10.55	13.61									
Média		12.76	10.41	13.40	7.73	2.73	1.00	0.55	0.00	0.09	12.09		
Mediana		12.3	10.03	11.35	9	2	0	0	0	0	11		

Continuação da tabela: Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre								Concentração: 2 µg/L						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	29	14	32	19	5	99	155	5	2	15	26	52	100	318
2	29	10	36	21	4	100	161	0	0	5	19	85	109	407
3	39	11	36	10	4	100	129	13	14	12	16	45	100	266
4	29	10	36	21	4	100	161	9	1	13	30	59	112	353
5	42	12	21	18	8	101	140	20	11	14	24	34	103	247
6	8	12	43	28	9	100	218	25	6	15	19	35	100	233
7	48	18	23	14	0	103	106	27	13	16	25	19	100	196
8	1	3	39	40	18	101	273	7	11	22	9	42	91	250
9	24	7	11	11	47	100	250	0	3	12	25	60	100	342
10	6	1	9	31	52	99	320	6	4	19	25	46	100	301
11	10	7	16	43	25	101	268	19	12	14	18	37	100	242
12	8	11	50	28	4	101	211	8	9	11	27	43	98	284
13	42	35	20	3	0	100	84	12	10	10	18	50	100	284
14	7	3	5	36	68	119	393	-	-	-	-	-	-	-
15	20	19	20	26	15	100	197	6	7	12	29	47	101	306
16	19	31	40	7	3	100	144	20	11	15	25	28	99	228
		22.563	12.7	27.3	22.3	16.6	201	11.8	7.6	13.6	22.3	45.4	283.8	
		22	11	27.5	21	6.5	179	9	9	14	25	45	284	

Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 9 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	F	12.50	10.30	14.49	8	5	0	0	0	0	13	2032	2045
2	F	14.70	11.90	23.66	2	2	0	0	0	0	4	1999	2003
3	M	15.70	12.60	25.16	11	4	2	4	0	0	21	1980	2001
4	M	12.70	10.10	13.87	10	4	0	0	0	0	14	2024	2038
5	M	11.20	9.00	8.36	1	0	0	0	0	0	1	2008	2009
6	M	13.40	10.70	15.50	23	3	3	0	0	0	29	1985	2014
7	M	11.00	8.80	8.08	0	2	0	1	0	1	4	2007	2011
8	M	10.50	8.50	7.60	5	2	0	1	0	0	8	2024	2032
9	-	10.70	8.50	7.90	8	5	0	0	0	0	13	2032	2045
10	F	11.10	9.10	9.76									
11	M	10.00	8.00	5.71									
12	F	16.80	13.70	37.32									
13	F	10.80	8.70	10.18									
14	M	11.40	9.30	9.77									
Média		12.32	9.943	14.1	7.5	2.75	0.625	0.75	0	0.125	11.75		
Mediana		11.3	9.2	9.975	6.5	2.5	0	0	0	0	10.5		

Continuação da tabela: Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre								Concentração: 9 µg/L						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	36	12	22	21	8	99	151	10	6	32	22	30	100	256
2	-	-	-	-	-	0	-	32	16	19	25	24	116	225
3	43	11	20	22	4	100	133	45	25	14	4	13	101	117
4	-	-	-	-	-	0	-	44	14	9	14	20	101	154
5	44	13	30	13	0	100	112	27	17	14	17	25	100	196
6	51	18	28	3	0	100	83	-	-	-	-	-	0	-
7	60	22	14	3	1	100	63	4	9	8	33	49	103	320
8	41	24	30	26	9	130	198	11	33	20	12	24	100	205
9	40	24	30	4	2	100	104	5	7	16	32	41	101	299
10	8	6	32	36	20	102	258	18	23	15	12	31	99	213
11	32	20	34	9	5	100	135	16	15	9	20	42	102	261
12	46	27	19	8	0	100	89	45	12	22	16	5	100	124
13	17	20	13	31	20	101	219	34	28	24	5	10	101	131
14	44	30	15	9	2	100	95	4	4	9	26	58	101	332
	38.5	18.9	23.9	15.4	5.92		137	22.692	16.076	16.2	18.3	28.6		217.92
	42	20	25	11	3		123	18	15	15	17	25		213

Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 18 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacuólo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	F	16.30	13.05	25.88	14	4	1	0	0	0	19	1982	2001
2	M	11.60	9.60	11.17	1	0	0	0	0	1	2	2095	2097
3	M	17.50	15.20	36.78	5	3	0	1	0	0	9	1991	2000
4	M	10.95	9.10	8.22	2	1	0	0	0	0	3	1997	2000
5	F	10.45	8.55	6.26	1	2	0	0	0	0	3	2005	2008
6	M	10.95	8.95	7.16	1	4	1	0	1	0	7	1993	2000
7	F	9.70	7.80	4.28	7	1	0	0	0	0	8	2005	2013
8	M	13.20	10.70	13.24	2	4	2	2	0	1	11	1990	2001
9	M	11.30	9.35	8.20	8	7	0	2	0	0	17	1984	2001
10	F	14.90	12.05	20.13									
11	M	10.20	8.20	6.55									
12		10.20	8.50	6.28									
13	M	10.85	8.80	6.64									
14	M	13.20	10.65	13.69									
15	M	10.45	8.45	8.16									
16	F	10.40	8.60	6.53									
Média		12.01	9.85	11.82	4.56	2.89	0.44	0.56	0.11	0.22	8.78		
Mediana		10.95	9.03	8.18	2.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.00		

Continuação da tabela: Experimento Semi-Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre								Concentração: 18 µg/L						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	-		-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-
2	-	-	-	-	-	0	-	10	5	28	30	28	101	263
3	-	-	-	-	-	0	-	17	13	20	25	25	100	228
4	43	21	23	10	3	100	109	19	13	13	24	33	102	243
5	-	-	-	-	-	0	-	2	4	12	25	57	100	331
6	-	-	-	-	-	0	-	2	6	14	24	53	99	318
7	-	-	-	-	-	0	-	7	6	10	21	56	100	313
8	44	16	32	8	0	100	104	8	2	22	24	44	100	294
9	40	17	20	12	1	90	97	9	12	10	16	53	100	292
10	48	20	19	8	5	100	102	35	7	18	33	7	100	170
11	42	27	22	22	1	114	141	19	13	21	32	25	110	251
12	-	-	-	-	-	0	-	8	0	3	26	75	112	384
13	49	19	19	9	4	100	100	5	6	8	20	60	99	322
14	40	14	29	9	8	100	131	12	12	41	21	14	100	213
15	42	25	18	13	2	100	108	6	3	12	27	60	108	348
16	44	27	17	5	6	99	100	4	8	14	12	62	100	320
	43.55	20.6	22.1	10.7	3.33		110	10.86	7.33	16.4	24	43.4		286
	43	20	20	9	3		104	8	6	14	24	53		294

Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: Controle								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	-	11.90	9.55	9.48	2	1	1	0	0	0	4	2033	2037
2	M	20.40	16.90	55.80	7	1	0	0	0	1	9	2014	2023
3	M	11.50	9.60	10.02	9	0	1	0	0	0	10	2049	2059
4	-	11.40	9.20	9.72	7	0	1	0	0	0	8	2093	2101
5	F	20.00	16.00	43.92	6	1	0	1	0	0	8	1995	2003
6	-	11.50	9.20	9.21	2	1	0	0	0	0	3	1997	2000
7	M	13.30	10.60	13.76	4	0	1	1	1	0	7	2041	2048
8	-	11.50	9.60	11.67	4	1	0	1	0	0	6	2020	2026
9	M	12.60	10.30	11.96	1	0	0	0	0	0	1	1999	2000
10	M	13.10	10.50	12.28	1	1	1	0	0	0	3	2018	2021
11	M	17.20	13.60	30.41	5	0	0	1	0	0	6	1999	2005
12	F	11.60	9.20	10.00	7	0	0	0	0	0	7	2104	2111
13	M	13.00	10.50	11.61	11	1	0	1	1	0	14	1991	2005
14	M	11.65	9.66	9.15	6	0	0	1	0	0	7	2044	2051
15	M	12.50	10.20	11.12	0	0	0	0	0	0	0	2059	2059
16	M	10.70	8.60	7.12	7	1	0	0	0	1	9	1994	2003
17	M	10.20	8.90	8.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	M	11.45	9.20	8.60	5	0	1	0	0	0	6	2027	2033
19	-	11.40	9.30	7.61	4	0	0	0	0	0	4	2009	2013
20	-	11.60	9.30	9.20	8	1	0	0	0	0	9		2004
Média		12.93	10.5	15.04	5.05	0.47	0.31	0.31	0.10	0.10	6.36		
Mediana		11.63	9.6	10.01	5	0	0	0	0	0	7		

Continuação da tabela: Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre								Concentração: Controle						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	-	-	-	-	-	-	-	23	32	18	14	13	100	162
2	15	16	29	29	11	100	205	19	35	24	16	6	100	155
3	62	27	11	0	0	100	49	31	27	25	15	2	100	130
4	-	-	-	-	-	-	-	40	28	19	9	4	100	109
5	29	39	13	12	7	100	129	37	17	16	19	11	100	150
6	-	-	-	-	-	-	-	40	28	18	9	5	100	111
7	57	32	10	1	0	100	55	33	32	22	12	1	100	116
8	82	17	1	0	0	100	19	20	20	18	24	18	100	200
9	74	18	6	2	0	100	36	67	20	4	4	5	100	60
10	82	11	5	2	0	100	27	92	5	1	1	1	100	14
11	87	8	3	2	0	100	20	69	22	5	2	2	100	46
12	61	28	7	4	0	100	54	62	10	12	12	4	100	86
13	77	17	5	1	0	100	30	33	23	18	17	9	100	146
14	79	19	2	0	0	100	23	68	17	9	4	2	100	55
15	84	10	6	0	0	100	22	64	19	8	6	3	100	65
16	94	6	0	0	0	100	6	88	11	1	0	0	100	13
17	89	8	1	2	0	100	16	78	8	6	6	2	100	46
18	93	7	0	0	0	100	7	64	11	8	8	9	100	87
19	82	12	5	1	0	100	25	44	18	9	20	9	100	132
20	69	20	11	0	0	100	42	46	24	22	7	1	100	93
	71.53	17.35	6.76	3.29	1.06		45.00	50.90	20.35	13.15	10.25	5.35		98.80
	79.00	17.00	5.00	1.00	0.00		27.00	45.00	20.00	14.00	9.00	4.00		101.00

Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 2 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	-	11.20	8.80	7.29	7	0	0	0	0	0	7	2033	2040
2	M	11.80	9.40	8.46	33	12	1	1	0	0	47	1953	2000
3	M	11.70	9.45	9.86	6	4	1	1	0	0	12	1998	2010
4	-	12.70	10.60	11.26	0	1	0	0	0	1	2	2019	2021
5	-	11.40	9.00	8.39	5	1	0	0	0	1	7	2031	2038
6	M	12.20	9.85	10.48	11	4	1	2	0	0	18	2000	2018
7	M	13.05	10.60	12.53	14	1	0	4	0	1	20	2088	2108
8	M	11.85	9.80	9.54	4	0	0	1	0	0	5	1995	2000
9	M	10.90	8.80	7.57	0	0	0	0	0	0	0	2020	2020
10	F	10.90	8.55	6.70	9	6	5	8	0	0	28	2004	2032
11	M	12.10	9.80	9.39	9	0	1	0	0	0	10	2009	2019
12	-	10.70	9.50	8.84	11	1	0	0	0	1	13	2013	2026
13	M	11.60	9.45	9.64	11	3	0	0	0	0	14	1986	2000
14	M	20.30	19.90	54.59	1	0	0	0	0	0	1	2000	2001
15	M	13.20	10.60	13.82	11	11	5	1	0	0	28	1989	2017
16	F	21.40	17.10	52.57	5	2	1	0	0	2	10	2032	2042
17	M	12.00	9.70	11.06	11	1	0	0	0	0	12	2016	2028
18	F	11.70	9.40	10.16	8	2	3	0	0	1	14	2134	2148
19	M	11.35	8.70	8.61	1	1	0	1	0	0	3	2021	2024
20	F	19.10	15.30	40.39	1	0	0	1	0	0	2	2001	2003
Média		13.06	10.72	15.56	7.9	2.5	0.9	1	0	0.35	12.65		
Mediana		11.83	9.6	9.75	7.5	1	0	0	0	0	11		

Continuação da tabela: Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Atrazina e Cloreto de Cobre								Concentração: 2 µg/L						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	21	37	26	14	2	100	139	21	15	20	23	21	100	208
2	31	31	16	14	8	100	137	73	13	4	4	6	100	57
3	69	19	9	0	3	100	49	77	10	5	6	2	100	46
4	22	46	22	8	2	100	122	43	24	20	11	2	100	105
5	-	-	-	-	-	-	-	31	21	23	18	7	100	149
6	66	27	5	2	0	100	43	-	-	-	-	-	-	-
7	8	41	38	19	3	109	186	-	-	-	-	-	-	-
8	83	11	5	1	0	100	24	40	29	24	5	2	100	100
9	7	8	14	36	35	100	284	59	28	12	1	0	100	55
10	11	10	12	49	18	100	253	51	24	13	9	3	100	89
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	4	11	25	46	14	100	255	19	33	22	18	8	100	163
13	-	-	-	-	-	-	-	57	21	12	8	2	100	77
14	6	1	18	46	29	100	291	83	12	2	1	2	100	27
15	83	17	0	0	0	100	17	49	15	17	12	7	100	113
16	6	3	17	41	33	100	292	69	21	7	3	0	100	44
17	76	13	9	2	0	100	37	70	29	1	0	0	100	31
18	5	8	14	46	27	100	282	79	16	3	2	0	100	28
19	13	12	20	38	17	100	234	65	13	11	9	2	100	70
20	5	24	35	27	9	100	211	55	22	13	8	2	100	80
	30.35	18.7	16.7	22.8	11.7		168.00	55.35	20.35	12.2	8.12	3.8		84.82
	13.00	13.0	16.0	19.0	8.00		186.00	57.00	21.00	12.0	8.00	2.0		77.00

Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 9 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	M	17.50	14.10	30.93	0	0	1	0	0	0	1	2052	2053
2	M	11.20	9.00	8.01	11	4	1	0	1	3	20	2005	2025
3	-	11.00	9.60	10.77	2	2	4	0	0	2	10	1992	2002
4	-	12.60	10.45	11.27	28	2	3	1	1	0	35	1985	2020
5	-	10.30	8.20	6.92	3	1	0	0	0	0	4	1997	2001
6	-	10.20	9.90	11.92	6	1	0	0	0	1	8	2012	2020
7	F	21.80	18.10	36.35	1	0	2	0	0	3	6	2029	2035
8	-	11.20	9.90	6.79	11	0	0	0	0	0	11	2001	2012
9	-	11.40	9.00	7.62	6	0	3	0	0	0	9	1991	2000
10	F	19.30	16.50	35.53	3	0	0	0	0	0	3	2048	2051
11	-	11.90	9.70	9.04	6	2	2	0	1	1	12	1995	2007
12	F	12.75	10.00	12.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	M	13.60	11.20	16.54	3	0	0	0	0	1	4	2021	2025
14	-	11.00	8.70	6.75	7	2	0	0	0	0	9	2004	2013
15	-	11.60	9.30	9.72	6	4	0	0	0	0	10	1998	2008
16	-	11.10	8.90	7.56	15	5	2	0	0	1	23	1991	2014
17	-	12.05	9.65	11.09	7	5	0	0	1	1	14	1987	2001
18	F	15.20	12.20	22.50	7	0	0	0	0	0	7	1997	2004
19	F ov	11.40	9.20	9.01	0	0	0	0	0	0	0	2020	2020
Média		13.01	10.72	14.24	6.77	1.55	1	0.05	0.22	0.72	10.33		
Mediana		11.6	9.7	10.77	6	1	0	0	0	0	9		

Continuação da tabela: Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Atrazina e Cloreto de Cobre								Concentração: 9 µg/L						
Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	7	6	18	48	21	100	270	52	19	18	7	4	100	92
2	1	5	19	25	50	100	318	-	-	-	-	-	-	-
3	3	2	19	59	17	100	285	15	25	15	30	15	100	205
4	1	1	18	34	46	100	323	1	8	30	29	32	100	283
5	7	12	14	29	38	100	279	-	-	-	-	-	-	-
6	8	19	36	22	15	100	217	-	-	-	-	-	-	-
7	3	4	40	50	3	100	246	8	18	26	36	12	100	226
8	1	2	36	55	6	100	263	4	12	28	30	26	100	262
9	-	-	-	-	-	-	-	27	13	32	20	8	100	169
10	16	26	41	17	0	100	159	-	-	-	-	-	-	-
11	8	14	26	41	11	100	233	-	-	-	-	-	-	-
12	8	3	10	42	37	100	297	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	35	36	18	9	2	100	107	-	-	-	-	-	-	-
15	7	9	41	38	5	100	225	37	34	18	10	1	100	104
16	6	7	30	35	22	100	260	31	35	20	10	4	100	121
17	25	33	33	8	1	100	127	11	33	27	17	12	100	186
18	6	10	22	29	33	100	273	80	16	4	0	0	100	24
19	-	-	-	-	-	-	-	61	29	5	4	1	100	55
	8.875	11.8	26.3	33.8	19.2		243	29.727	22	20.2	17.5	10.4		157
	7	8	24	34.5	16		262	27	19	20	17	8		169

Experimento Estático: Exposição ao Cloreto de Cobre por 96 horas

Xenobionte: Cloreto de Cobre					Concentração: 18 µg/L								
Características					Teste do Micronúcleo Písceo								
n°	Sexo	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Vacúolo	Notched	Blebbled	Lobed	Binúcleo	Micronúcleo	Alterações +MN	Normais	Total
1	M	11.95	9.70	8.78	23	0	0	0	0	1	24	1981	2005
2	M	18.80	14.80	41.00	5	0	3	0	0	1	9	2004	2013
3	F	13.60	11.20	15.75							-	-	
4	-	10.20	8.05	5.97	15	1	1	0	0	0	17	1994	2011
5	M	19.60	16.40	48.75	3	3	1	2	0	0	9	2000	2009
6	F	16.60	9.50	9.94	6	1	1	0	0	0	8	2014	2022
7	F	10.90	8.80	9.17	5	2	0	8	0	1	16	2015	2031
8	-	12.00	9.80	10.08	12	2	1	0	0	0	15	2000	2015
9	M	11.70	9.50	9.70	24	1	1	0	0	2	28	2032	2060
10	M	12.30	9.80	11.86							-	-	
11	-	11.00	8.80	8.07	11	3	3	3	0	0	20	1995	2015
12	M	11.30	8.80	8.74							-	-	
13	F ov	13.60	11.10	15.79	6	0	3	0	0	2	11	1995	2006
14	F ov	15.70	12.70	29.49	5	1	0	0	0	1	7	2022	2029
15	M	11.80	9.40	9.40	16	1	1	0	0	0	18	2012	2030
16	M	13.30	10.70	15.48	12	0	0	1	0	1	14	2034	2048
17	M	11.00	9.10	8.17	1	2	1	0	0	0	4	2008	2012
18	F	12.00	9.70	9.30	5	0	0	0	1	1	7	2013	2020
19	M	11.70	9.80	10.49	4	0	2	0	0	0	6	2023	2029
20	M	11.40	9.40	8.85	3	0	2	0	0	0	5	2004	2009
21	M	10.40	8.40	6.81	14	6	2	0	0	0	22	1978	2000
22	M	12.00	10.00	11.78	1	2	2	2	0	1	8	2013	2021
23	M	11.00	9.60	10.44	7	2	2	2	0	1	14	2007	2021
Média		12.8	10.2	14.1	8.9	1.4	1.3	0.9	0.1	0.6	11.4		
Mediana		12.0	9.7	9.9	6.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.5	9.0		

Concentração: 18 µg/L

Ensaio Cometa														
n°	Eritrócitos							Brânquias						
	Classes							Classes						
	0	1	2	3	4	Total	Escore	0	1	2	3	4	Total	Escore
1	4	9	5	44	38	100	303	33	31	18	16	2	100	123
2	5	11	7	35	42	100	298	56	4	4	24	12	100	132
3	-	-	-	-	-	-	-	32	19	13	15	21	100	174
4	6	4	5	42	43	100	312	11	7	29	39	14	100	238
5	5	5	29	35	26	100	272	6	11	20	21	42	100	282
6	3	2	3	41	51	100	335	9	14	33	32	12	100	224
7	5	15	11	36	33	100	277	8	14	30	32	16	100	234
8	1	3	1	57	38	100	328	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	11	9	28	41	11	100	232
10	4	4	5	47	40	100	315	19	25	15	27	14	100	192
11	-	-	-	-	-	-	-	17	37	23	14	9	100	161
12	4	14	35	32	15	100	240	19	37	21	13	10	100	158
13	-	-	-	-	-	-	-	12	36	22	18	12	100	182
14	6	2	5	37	50	100	323	47	22	10	8	13	100	118
15	-	-	-	-	-	-	-	7	13	18	28	24	90	229
16	7	7	22	45	19	100	262	20	33	33	11	3	100	144
17	7	8	26	41	18	100	255	12	24	24	31	9	100	201
18	-	-	-	-	-	-	-	16	22	17	29	16	100	207
19	-	-	-	-	-	-	-	6	18	19	29	28	100	255
20	-	-	-	-	-	-	-	32	34	28	6	0	100	108
21	1	12	26	48	13	100	260	-	-	-	-	-	-	-
22	2	3	3	36	56	100	341	2	16	35	34	13	100	240
23	6	2	14	55	23	100	287	24	16	32	23	5	100	169
	4.4	6.7	13.1	42.1	33.7		293.9	19.0	21.0	22.5	23.4	13.6		190.6
	5.0	5.0	7.0	41.0	38.0		298.0	16.0	19.0	22.0	24.0	12.0		192.0